

医薬品・機能性食品添加物分離精製用合成吸着剤および
新規分離精製方法の開発に関する研究

足立 正

目次

理論の部

第一章 緒論	1
第二章 工業用合成吸着剤の特性解析	
第一節 研究の背景	3
第二節 合成吸着剤の基礎特性の測定	5
第三節 合成吸着剤の被吸着物質に対する平衡吸着量の測定	9
第四節 合成吸着剤の化学的および物理的特性と 平衡吸着量との相関	14
第五節 合成吸着剤の物理的特性と動的吸着挙動との相関	17
第三章 工業用合成吸着剤の順相系分離プロセスへの適用	
第一節 研究の背景	22
第二節 合成吸着剤の順相系移動相における保持挙動	22
第三節 不飽和脂肪酸の分離精製	25
第四節 生薬系化合物の分離精製	27
第五節 トコフェロールおよびトコトリエノールの分離精製	28
第六節 コエンザイム Q10 の分離精製	32
第七節 カプサイシノイド化合物の分離精製	33
第八節 アスタキサンチンの分離精製	36

第四章 合成吸着剤のクロマトグラフィー分離挙動の特性化	
第一節 研究の背景	41
第二節 低分子化合物の保持挙動	41
第三節 トコフェロールおよびトコトリエノールの分離挙動	44
第四節 ステロイド系化合物の分離挙動	45
第五節 ポリエン系抗生物質の分離挙動	46
第五章 医薬品・機能性食品添加物の高度精製用合成吸着剤の開発	
第一節 研究の背景	49
第二節 小粒径合成吸着剤の開発	49
第三節 小粒径合成吸着剤の分離性能検証	53
第六章 結論	63
謝辞	66

実験の部

第二章	第二節に関する実験	67
第二章	第三節に関する実験	67
第二章	第五節に関する実験	68
第三章	第二節に関する実験	68
第三章	第三節に関する実験	69
第三章	第四節に関する実験	70
第三章	第五節に関する実験	70
第三章	第六節に関する実験	72
第三章	第七節に関する実験	72
第三章	第八節に関する実験	73
第四章	第二節に関する実験	73
第四章	第四節に関する実験	74
第四章	第五節に関する実験	74
第五章	第二節に関する実験	75
第五章	第三節に関する実験	75
引用文献		81

第一章 緒論

合成品、天然由来品を問わず医薬品や機能性食品添加物の分離精製工程において、吸脱着やクロマトグラフィーは極めて重要な工程である。これらの工程で使用される分離剤の一つが合成吸着剤である。三菱ケミカル株式会社では合成吸着剤の製造販売を行っているため、著者は入社以来、一貫して新規合成吸着剤の開発と合成吸着剤による新規分離法の開発研究に従事し、以下に要約する学術的かつ実用的な成果を挙げた。

合成吸着剤は、Figure 1-1 に示すように多孔質構造を有する球状架橋高分子粒子であり、合成吸着剤への化合物の吸着は、化合物と合成吸着剤との疎水性相互作用を基盤として成立する。合成吸着剤は特徴的な製造技術を駆使して成し遂げられた多孔質構造が重要であり、被吸着物質に対して大きな吸着容量を示す。

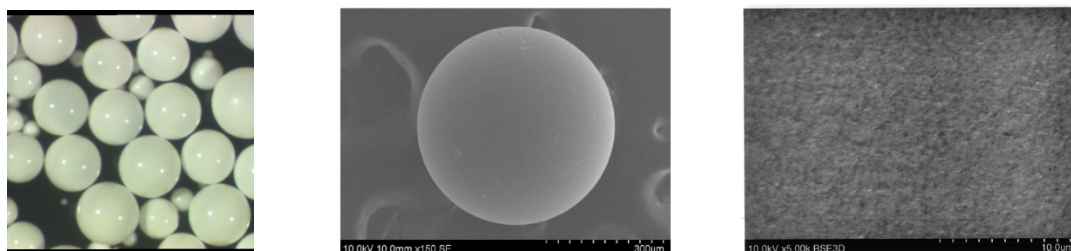


Figure 1-1. 合成吸着剤 DIAION™ HP20 の外観像

(左から光学顕微鏡像、走査型電子顕微鏡像、走査型電子顕微鏡拡大像)

複数の工業用合成吸着剤を用いて、分子量の異なる様々な医薬品や機能性食品添加物の平衡吸着量を測定した。得られた平衡吸着量と合成吸着剤の細孔構造との相関を検証し、吸着量の最大化には吸着対象化合物の分子量と合成吸着剤の細孔径とのバランスが重要であることを明確化した。

工業用合成吸着剤は、逆相系での吸脱着工程やクロマトグラフィー工程に多用されているが、順相系移動相の適用検討を実施し、合成吸着剤でも脂溶性医薬品や機能性食品

添加物の分離精製が可能であることを明確にした。

医薬品や機能性食品添加物の分離精製要求水準の高度化への対応として、合成吸着剤のクロマトグラフィー分離挙動の特性化を行い、化合物中に存在する炭素－炭素不飽和結合に対する強い相互作用に基づく特徴的な分離挙動を示すことを明らかにした。

医薬品や機能性食品添加物の分離精製要求水準の高度化に対応すべく、工業用合成吸着剤の粒子径範囲である 100 μm ～ 500 μm より小粒子径の合成吸着剤を開発した。粒子径 20 μm および 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤を商品化するとともに、粒子径 30 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を商品化した。また、各粒子径の合成吸着剤の分離性を評価した。小粒子径合成吸着剤が充填された HPLC カラムを用いて目的化合物の分離精製条件を最適化したところ、粒子径の大きな合成吸着剤を用いた効率的な分取精製プロセスの構築が可能であることを示した。

以上著者は、新規合成吸着剤の開発・商品化とともに、合成吸着剤を利用した様々な新規分離法を開発した。これらの合成吸着剤や分離法の適用により、医薬品や機能性食品添加物の精製効率の向上と工業化への寄与が期待される。

以下、得られた知見を各章に分けて詳述する。

第二章 工業用合成吸着剤の特性解析

第一節 研究の背景

第一章で述べたように、合成吸着剤は多孔質構造を有する球状架橋高分子粒子であり、合成吸着剤への化合物の吸着は、化合物と合成吸着剤との疎水性相互作用を基盤として

いる。

合成吸着剤はその多孔質構造と吸着原理から活性炭と比較されるが、数～数十 nm の細孔径を精密に制御することができるため、分子篩い効果による選択的吸着を効率よく利用出来る点が活性炭との大きな差異である。また、吸着された化合物を比較的容易に溶離出来るため、単なる吸着除去のみならず、分離精製にも利用されるとともに繰返し使用が可能である等の利点を有する。

また、アルキル基結合シリカゲル系吸着剤も比較対象となるが、ポリスチレン系高分子やポリメタクリル酸エステル系高分子を基本骨格とする合成吸着剤は酸性・アルカリ性双方の条件下での耐久性に優れているため、広範囲な吸着・溶離条件を適用できる。さらに、シリカゲル系吸着剤の場合に懸念される吸着剤溶解物の混入は極微であり、アルカリ滅菌に代表される CIP (Clean In Process) が可能である点もアルキル基結合シリカゲル系吸着剤には無い特徴である。このように、合成吸着剤は医薬品や機能性食品添加物の分離精製工程に適しており、実際に多くの適用事例が報告されている¹⁾。

合成吸着剤を用いて分離精製される化合物の一例として、生薬成分や天然色素成分等の植物抽出物、ペニシリンやセファロsporin C 等の発酵系の抗生物質、インスリン等のペプチドや蛋白質、またビタミン、各種ポリフェノール等の機能性食品添加物などが挙げられる²⁾。

被吸着物質の性質は水に中程度の溶解性を示すことが望まれる。例えば、多くのアミノ酸や単糖類など、水への溶解性が極端に高い化合物の場合は合成吸着剤との疎水性相

相互作用が弱く、吸着量が低下するため合成吸着剤を使用した分離精製には不向きである。このような化合物にはイオン交換基が含まれていることが多いため、イオン交換分離や、サイズ排除分離などで分離精製されることが多い。一方、水への溶解性が極端に低い化合物は有機溶媒系で処理され、各種溶媒抽出法や順相吸着分離が用いられることになる。なお、順相吸着分離では後述のようにポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の使用が可能となる場合がある。

このように、合成吸着剤は医薬品や機能性食品添加物の分離精製プロセスに利用されてきたが、個々の事例はユーザーにより経験的・試行錯誤的に任されていたケースが多く、合成吸着剤の基礎物性や分離精製対象物質の物性が網羅的に考察されたものではなかった。

そこで合成吸着剤の製造販売者の立場にある著者は、合成吸着剤の医薬品や機能性食品添加物の分離精製工程への更なる適用範囲の拡大や、適用条件の最適化・条件検討の効率化を目的として、その基礎物性と分離精製対象物質の物性の詳細な相互作用解析を実施した。

第二節 合成吸着剤の基礎特性の測定

合成吸着剤の基礎特性は、「化学的特性」と「物理的特性」に分類される。三菱ケミカル株式会社では Figure 2-1 に示すようにポリスチレン系（左）、修飾型ポリスチレン系（中）およびポリメタクリル酸エステル系（右）の3種類の化学的特性が異なる合成吸着剤を工業製品として製造販売しているが、この中でもスチレンーギビニルベンゼン共重合体から成るポリスチレン系合成吸着剤が最も汎用されている。

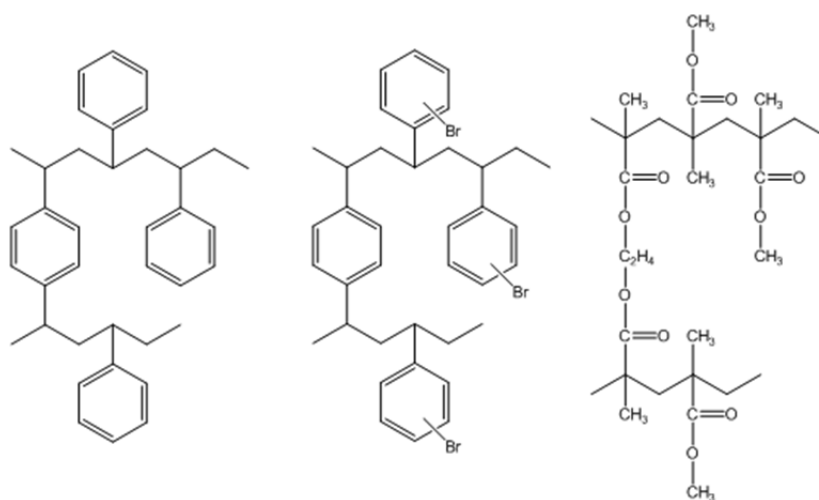


Figure 2-1. ポリスチレン系、修飾型ポリスチレン系およびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の基本化学構造

スチレンーギビニルベンゼン共重合体に臭素を付加させると、臭素の電子吸引性によりポリマーバックボーンの疎水性が高まるため高い吸着性を示す。また、比重が約 1.2 と大きくなるため、高密度溶液を送液しても樹脂の浮上による分離性能低下が抑制されるとともに、発酵液のような濁質を含む液の送液では、上向流させることで濁質分を吸着塔外に排出させながら目的物質を吸着させる「吸着流動床 (Expanded Bed Adsorption)」法にも適している³⁾。一方で、強い吸着力のために吸着された化合物の溶離に比較的多めの溶離剤や、高濃度有機溶媒の使用が必要となる場合がある点が欠点

である。

前記 2 種の合成吸着剤とは全く異なる化学構造を有するのがポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤である。Figure 2-1 に示す通り、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤にはエステル基が共存しており、ポリスチレン系合成吸着剤より極性が高く、特に、エステル基と水素結合する官能基を持つ化合物に対して異なる吸着性が期待される。

次に合成吸着剤の代表的な物理的特性を Table 2-1 にまとめた。

	型番	種類	見掛 密度* (g/L)	水分 (%)	粒子径分布 (> 250 μm , %)	有効径 (mm)	均一 係数	比表面積* (m^2/g)	細孔容積* (mL/g)	細孔半径* (nm)	真比重* (g/mL)
1	SP850	ポリスチレン系	690	46 - 52	> 90	> 0.25	< 1.6	930	1.1	4.5	1.01
2	SP825L	ポリスチレン系	690	52 - 62	> 95	> 0.25	< 1.6	930	1.4	7	1.01
3	SP70	ポリスチレン系	690	57 - 67	> 95	> 0.25	< 1.6	870	1.5	7	1.01
4	SP700	ポリスチレン系	690	60 - 70	> 95	> 0.25	< 1.6	1,200	2.2	9	1.02
5	HP21	ポリスチレン系	680	50 - 60	> 90	> 0.25	< 1.6	640	1.3	11	1.01
6	HP20	ポリスチレン系	690	55 - 65	> 90	> 0.25	< 1.6	590	1.3	29	1.01
7	SP207	修飾 ポリスチレン系	790	43 - 53	> 90	> 0.25	< 1.6	600	1.0	11	1.18
8	HP2MGL	ポリメタクリル 酸エステル系	720	55 - 65	> 99 (> 355 μm)	> 0.40	< 1.6	570	1.3	24	1.09

Table 2-1. 合成吸着剤の物理的特性 (*: 参考値)

見掛密度とは、一定体積の合成吸着剤の水切り重量であり、工業的に樹脂体積を規定するために必要な値である。

水分とは、水切り状態の合成吸着剤がその細孔内に保持する水分値であり、合成吸着剤の固形分の割合を表すとともに多孔性を表す指標の一つとなる。

学術的には「平均粒子径」が重要となるが、工業的には樹脂塔の底部に設置するスクリーンのメッシュ選定に重要となる「有効径（体積分布において粒子径の大きな方から

90 %となる粒子径)」や「規定粒子径以上の体積含有率」(Table 2-1 では粒子径分布と表記)、また樹脂塔の通液圧力に影響を及ぼす「均一係数 (体積分布において粒子径の大きな方から 40 %となる粒子径を粒子径の大きな方から 90 %となる粒子径で除した値)」が規格として規定される。

合成吸着剤の物理的特性のうち、分離精製プロセスにおいて極めて重要な指標は細孔物性であり、「比表面積」、「細孔容積」および「細孔径」と「細孔分布」が測定される。

比表面積は乾燥状態の合成吸着剤を用いて窒素吸着法で測定され、単分子吸着性を示す基本的指標である。

細孔容積、細孔径と細孔分布も窒素吸着法で求められ、窒素加圧時の圧力上昇に伴う細孔内での窒素の凝縮挙動から算出する。特に細孔径と細孔分布が被吸着物質の分子篩い効果に大きな影響を与える指標となる。

Figure 2-2 に合成吸着剤各型番の窒素吸着法により求められた細孔分布を示す。

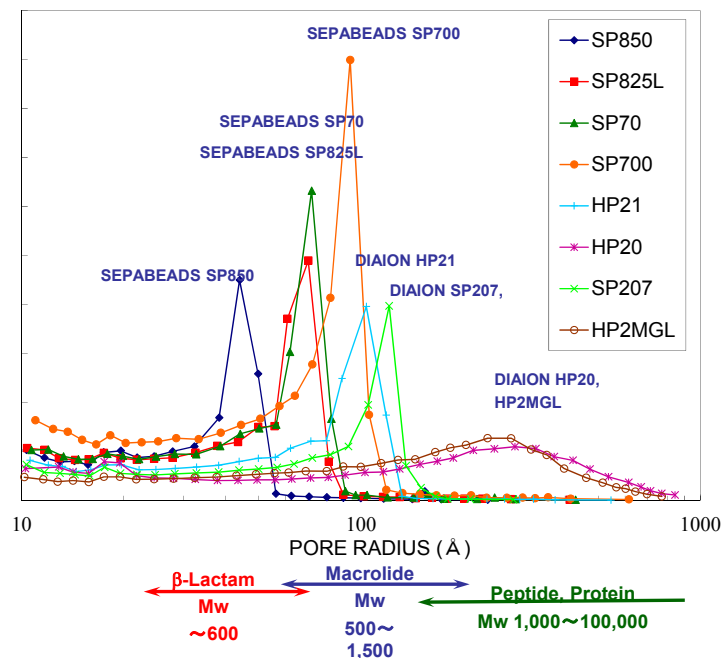


Figure 2-2. 合成吸着剤各型番の細孔分布

Figure 2-2 に示す通り、細孔径と細孔分布が異なる合成吸着剤のラインアップが揃え

ば、分子サイズの小さな被吸着物質から分子サイズの大きなものまで、広範囲な対応が可能となる。次節では、様々な医薬品や機能性食品添加物の吸着挙動を測定し、具体的に解析した結果を示す。

第三節 合成吸着剤の被吸着物質に対する平衡吸着量の測定

合成吸着剤の化学的特性および物理的特性と医薬品や機能性食品添加物の吸着特性との相関を包括的に把握するため、様々な化合物の合成吸着剤に対する平衡吸着量を測定した。

平衡吸着量測定に使用したそれぞれの合成吸着剤製造ロットにおける物理的特性を Table 2-2 に示す。なお、SP825、HP2MG はそれぞれ SP825L、HP2MGL (Table 2-1) と同一処方・工程で製造されるグレードであり、粒子径のみが異なる (小さい)。

	型番	種類	比表面積 (m ² /g)	細孔半径 (nm)	細孔容積 (mL/g)	平均粒子径 (mm)	見掛密度 (g/L)	水分 (%)	比表面積 (m ² /mL)
1	SP850	ポリスチレン系	894	4.9	1.11	0.45	698	51.9	300
2	SP825	ポリスチレン系	908	6.4	1.56	0.45	676	55.9	271
3	SP700	ポリスチレン系	1123	8.2	2.15	0.53	691	65.9	265
4	SP70	ポリスチレン系	885	7.3	1.65	0.53	675	61.8	228
5	HP21	ポリスチレン系	658	10.7	1.45	0.44	682	54.9	202
6	HP20	ポリスチレン系	570	30.0	1.36	0.44	682	58.9	160
7	SP207	修飾ポリスチレン系	565	12.1	1.12	0.46	789	50.7	220
8	HP2MG	ポリメタクリル酸 エステル系	557	19.8	1.16	0.49	732	64.1	146

Table 2-2. 平衡吸着量測定に用いた合成吸着剤の物理的特性

また、平衡吸着量の測定に使用した医薬品や機能性食品添加物とその分子量、吸着液組成および平衡吸着前後の濃度定量に用いた紫外-可視吸光光度計の測定波長を Table 2-3 に、化学構造を Figure 2-3 にそれぞれ示す。

平衡吸着量は温度 5 °C、吸着時間は 18 h の振盪後に測定した。

化合物	分子量 (Da)	吸着液組成	検出波長
Cephalexin	347	Deminerlized water	UV 260 nm
Berberine chloride	372	Deminerlized water	VIS 416 nm
Tetracycline hydrochloride	481	Deminerlized water	VIS 356 nm
Rifampicin	823	20 mM Sodium citrate buffer, pH 4.0	VIS 474 nm
Vitamin B12	1355	Deminerlized water	VIS 360 nm
Bovine insulin	5734	50 mM Sodium citrate buffer, pH 2.5	UV 275 nm

Table 2-3. 平衡吸着量測定に使用した化合物と測定条件

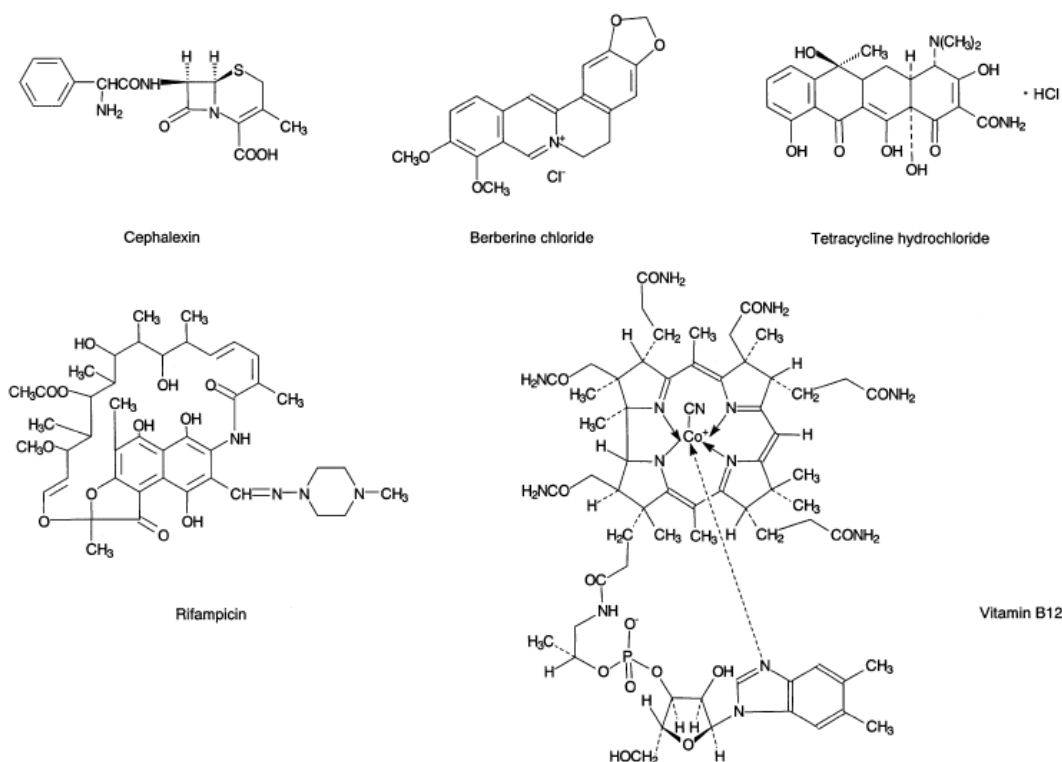


Figure 2-3. 平衡吸着量測定に使用した化合物の化学構造

Figure 2-4 から Figure 2-9 に各化合物の各種合成吸着剤に対する平衡吸着挙動を示す。X 軸は振盪後の吸着液中の化合物濃度、Y 軸はその濃度における合成吸着剤 1 L あたりの化合物の吸着量である。

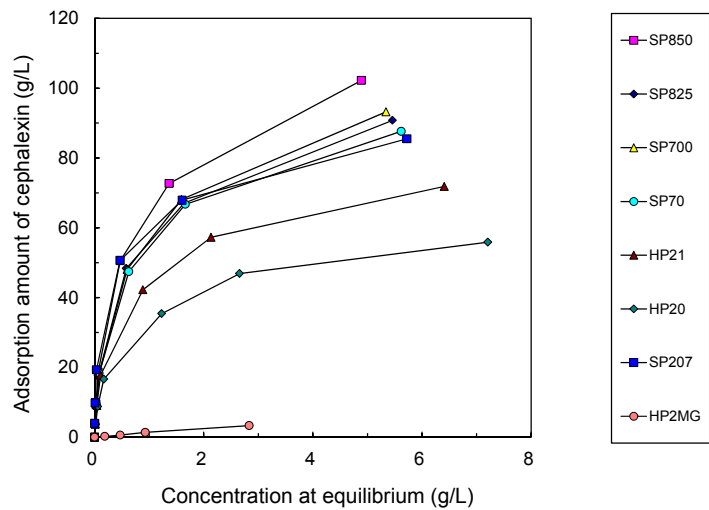


Figure 2-4. セファレキシンの各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係
(5 °C)

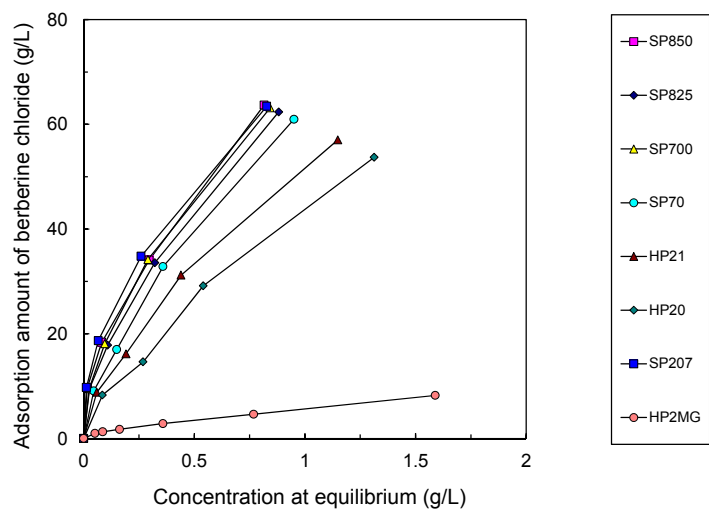


Figure 2-5. 塩化ベルベリンの各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係
(5 °C)

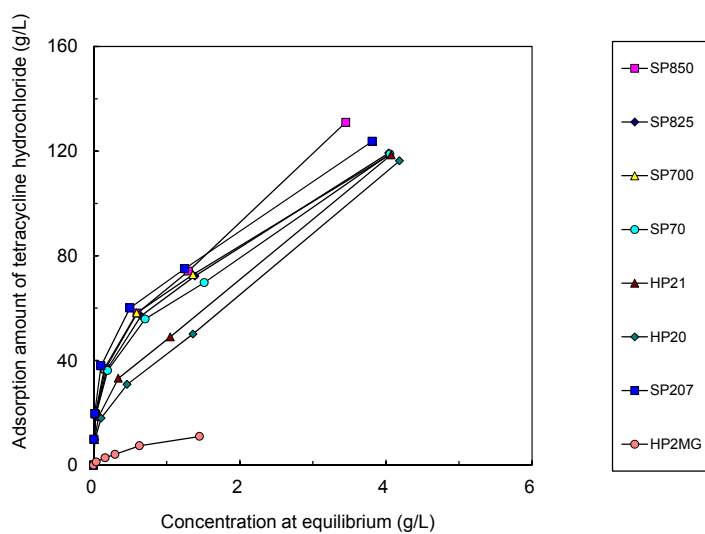


Figure 2-6. テトラサイクリン塩酸塩の各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係 (5 °C)

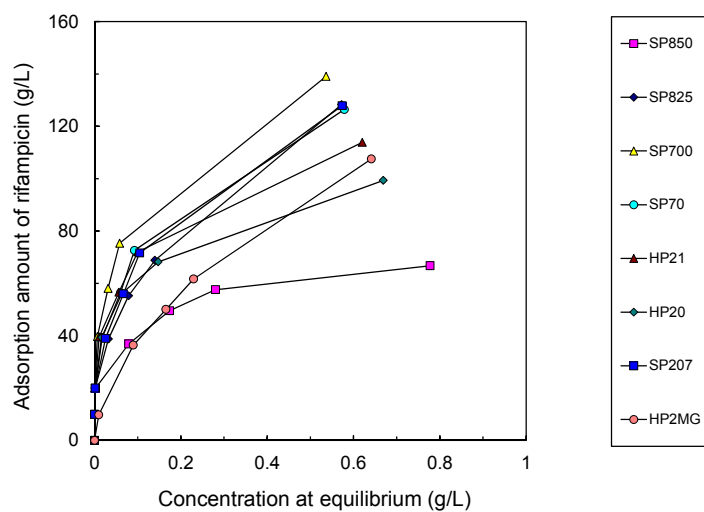


Figure 2-7. リファンピシンの各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係 (5 °C)

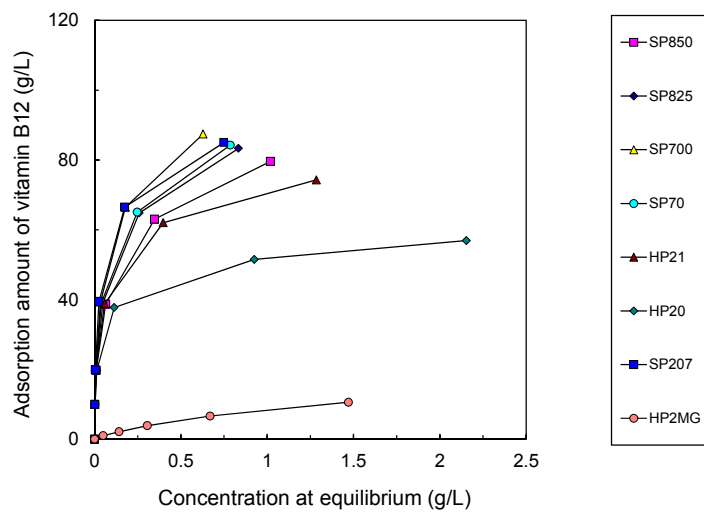


Figure 2-8. ビタミン B12 の各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係 (5 °C)

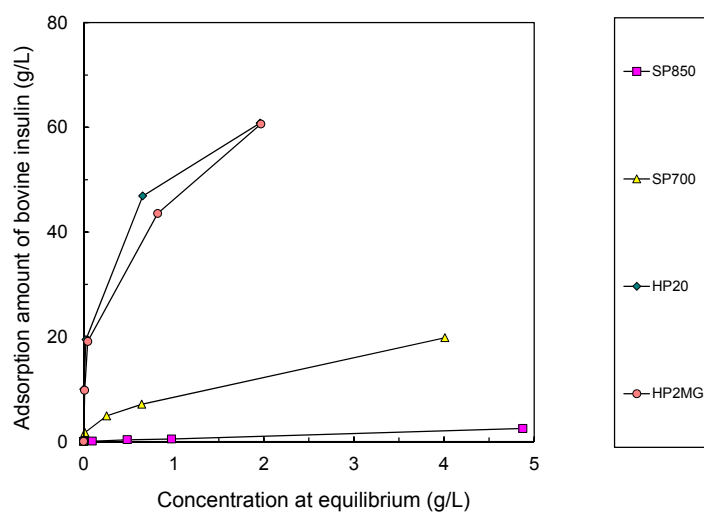


Figure 2-9. インスリンの各種合成吸着剤に対する吸着量と平衡濃度との関係 (5 °C)

第四節 合成吸着剤の化学的および物理的特性と平衡吸着量との相関

第三節に基づいて合成吸着剤の化学的特性と医薬品や機能性食品添加物の吸着量との相関を考察した。Table 2-2 に示したように、ポリスチレン系合成吸着剤である HP20 や HP21 と修飾ポリスチレン系合成吸着剤 SP207 は細孔半径並びに単位体積当たりの比表面積などの細孔物性が類似している。SP207 がいずれの化合物に対しても最も高い吸着性を示した(Figure 2-4 から Figure 2-8)が、これはスチレンージビニルベンゼン共重合体に臭素基を付加させたことにより疎水性が高くなったと考えれば合理的である (ブロモベンゼンのオクタノール/水分配係数 (log Kow)が 2.99 でベンゼン(2.13)よりも高いことが Hansh らにより報告されている⁴⁾)。

また、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤である HP2MG と細孔半径、単位体積当たりの比表面積などの細孔物性が類似するポリスチレン系合成吸着剤 HP20 や HP21 を比較すると、いずれもポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の吸着性が低い(Figure 2-4 から Figure 2-8)。これはポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を構成するメタクリル酸メチルの log Kow は 1.38⁴⁾、同じくエチレングリコールジメタクリレートは 2.21 (KOWWIN v1.68⁵⁾による計算値)であるが、ポリスチレン系合成吸着剤を構成するスチレンでは 2.95⁴⁾、さらにジビニルベンゼンは 3.80 (KOWWIN v1.68⁵⁾による計算値)であり、疎水性相互作用の程度が異なることに起因するものと考察している。

一方、インスリンのポリスチレン系合成吸着剤 HP20 とポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 HP2MG に対する平衡吸着挙動はほぼ同等であった (Figure 2-9)。ポリペプチドであるインスリンは多数のアミド結合を持ち、またアミノ酸側鎖にもカルボキシル基、水酸基、アミノ基等、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を構成するエステル結合と水素結合を形成しうる官能基が多数存在することから、疎水性相互作用による吸着性の低さを水素結合等により補完しているものと考えている。

次に、それぞれの化合物の平衡濃度 0.5 g/L における合成吸着剤に対する平衡吸着量

を求め、Figure 2-10 および Figure 2-11 にポリスチレン系合成吸着剤単位体積当たりの比表面積を X 軸としてプロットした。

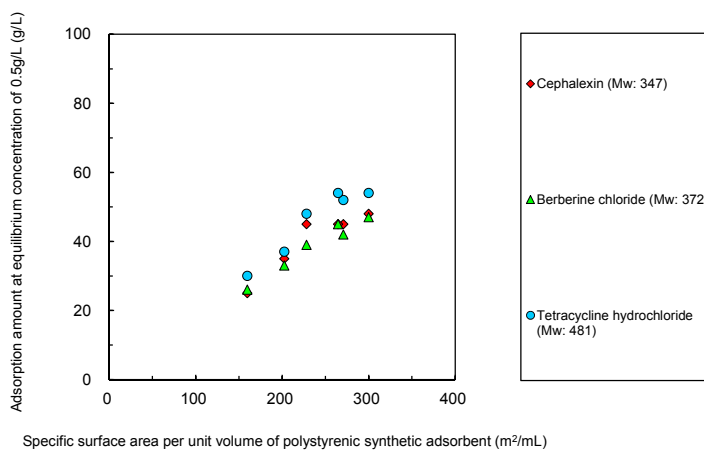


Figure 2-10. 各化合物の平衡濃度 0.5 g/L における平衡吸着量とポリスチレン系合成吸着剤単位体積当たりの比表面積との関係

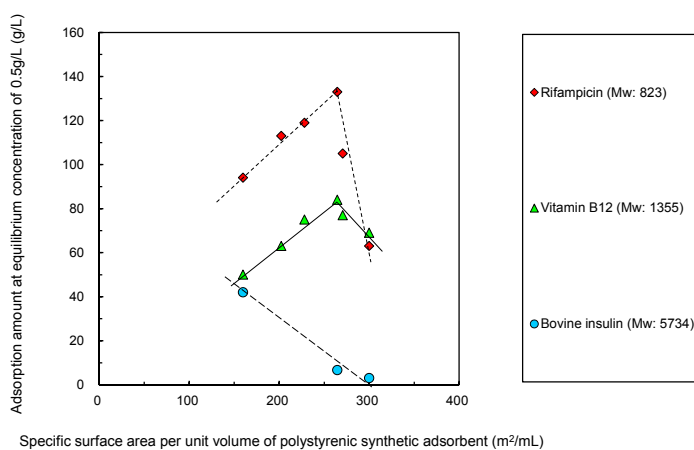


Figure 2-11. 各化合物の平衡濃度 0.5 g/L における平衡吸着量とポリスチレン系合成吸着剤単位体積当たりの比表面積との関係

分子量が 500 以下の比較的小さな分子であるセファレキシム、塩化ベルベリンおよびテトラサイクリン塩酸塩では、ポリスチレン系合成吸着剤の単位体積当たりの比表面積と平衡吸着量との間に高い正相関が認められた (Figure 2-10)。すなわち、合成吸着剤の細孔径に対して分子サイズが小さい場合には、基本化学構造が同一で細孔径が異なる合成吸着剤に対する平衡吸着量は比表面積から予測できるため、合成吸着剤の型番選択や使用量の決定に効果的である。

一方、分子量が 823 のリファンピシムと 1,355 のビタミン B12 についてはポリスチレン系合成吸着剤の単位体積当たりの比表面積が 260 m²/mL までは平衡吸着量との高い正相関が認められるが、それ以上になると顕著な低下が認められた (Figure 2-11)。この理由としては、単位体積当たりの比表面積が高いポリスチレン系合成吸着剤は細孔径が小さいため、分子量 500 以上の化合物においては拡散浸透が困難な細孔領域の比率が高くなるためであると推察された。

分子量が 5,734 のインスリンの場合には、ポリスチレン系合成吸着剤の単位体積当たりの比表面積と平衡吸着量は負の相関を示した。インスリンは溶液中で 6 量体を形成し、その分子サイズが直径 5.0 nm、高さ 3.5 nm⁶⁾であることから、細孔半径が 10 nm 以下の合成吸着剤では拡散浸透可能な細孔領域の比率が極めて低くなるためと考えられる。

以上、合成吸着剤のみならず、医薬品や機能性食品添加物の化学的特性 (インスリンにおけるペプチド結合など) や物理的特性 (分子サイズなど) が深く作用し合うことで吸着性が決定することが明確となった。

第五節 合成吸着剤の物理的特性と動的吸着挙動との相関

第四節で合成吸着剤の化学的特性や物理的特性と平衡吸着量の相関を検証したが、工業的分離精製プロセスでバッチ吸脱着プロセスが用いられる事例は少なく、分離剤を充填した充填塔に通液するカラム吸脱着プロセスやクロマトグラフィー分離プロセスが多用される。

この場合、合成吸着剤への吸着挙動は合成吸着剤の物理的特性の影響をより強く受けることとなる。

粒子径は最も重要な因子である。粒子径のみが異なる同一処方・工程で製造されたポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 HP2MG（平均粒子径: 490 μm ）と、SP2MGS（平均粒子径: 145 μm ）に対するインスリンのカラムを使った動的吸着挙動を検討した (Figure 2-12)⁷⁾。

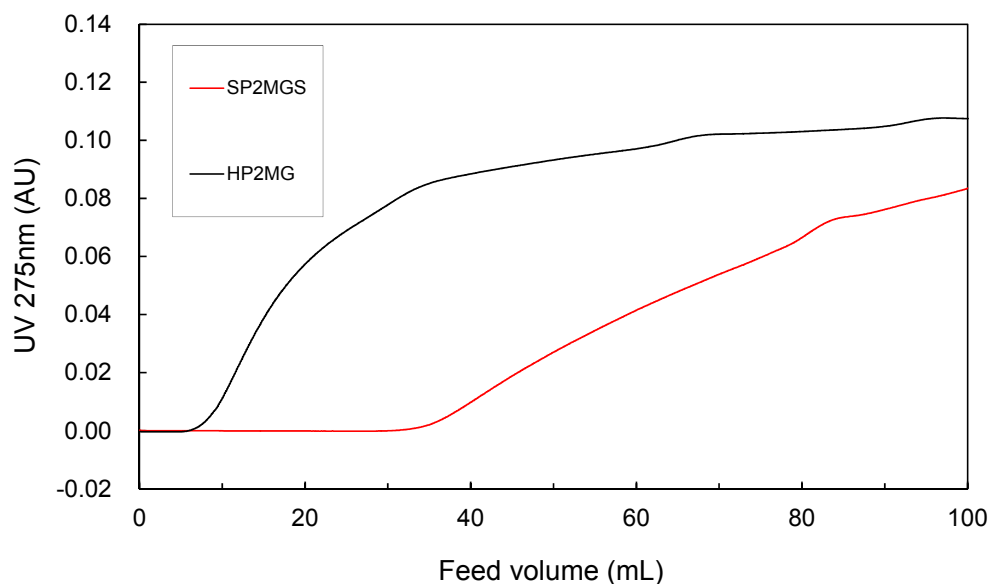


Figure 2-12. 平均粒子径の異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤に対するインスリンの動的吸着挙動

インスリン供給液濃度を 5 g/L、カラム体積を 5.0 mL（カラムサイズ: 100 x 8.0 mm

I.D.)、空塔速度 (Space velocity, SV) を 15 h^{-1} (流速: 1.25 mL/min) とした場合、平均粒子径が大きい ($490 \text{ }\mu\text{m}$) HP2MG では通液初期からカラム出口でインスリンに特有の 275 nm における吸収が認められ、漏出が確認された。しかし、平均粒子径が小さな ($145 \text{ }\mu\text{m}$) SP2MGS の場合にはインスリンのカラム出口からの漏出開始が遅延し、 35 mL 程度通液した後にゆっくりと溶出が始まった。分子量の大きなインスリンの合成吸着剤粒子細孔内部への拡散に時間がかかるため、粒子径が大きな合成吸着剤ではインスリンが粒子内部まで拡散浸透し吸着される前にカラムから流出した結果であり、粒子径が小さく、より密に充填された合成吸着剤を用いることで動的吸着挙動が向上したものと考えれば合理性がある。

カラム出口のインスリン濃度が供給液濃度の 1% となった時点におけるカラムへのインスリン供給量をカラム体積で除した値、すなわち 1% Breakthrough capacity (1% BTC)を求めたところ、HP2MG では 7.2 mg/mL であったが、粒子径の小さい SP2MGS では 34.2 mg/mL と 4 倍以上の値を示した。Figure 2-9 の吸着等温線より求められる HP2MG に対するインスリンの平衡濃度 2 g/L での平衡吸着量は 61 mg/mL であり、SP2MGS の場合は平衡吸着量の約 56% を利用できることが判明した。

次に、動的吸着挙動への細孔構造の影響を把握するため、粒子径がほぼ同一で細孔構造の異なるポリスチレン系合成吸着剤を使用して、分子量が 347 であるセファレキシンと分子量が $1,355$ であるビタミン B12 のカラム通液を検討した。

供給液濃度をそれぞれ 6 g/L 、カラム体積を 40 mL (カラム内径: 16 mm , 充填層高: 200 mm)、空塔速度 (Space velocity, SV) を 4 h^{-1} (平均流速: 2.67 mL/min) として得られた結果を Figure 2-13 および Figure 2-14 に示した。

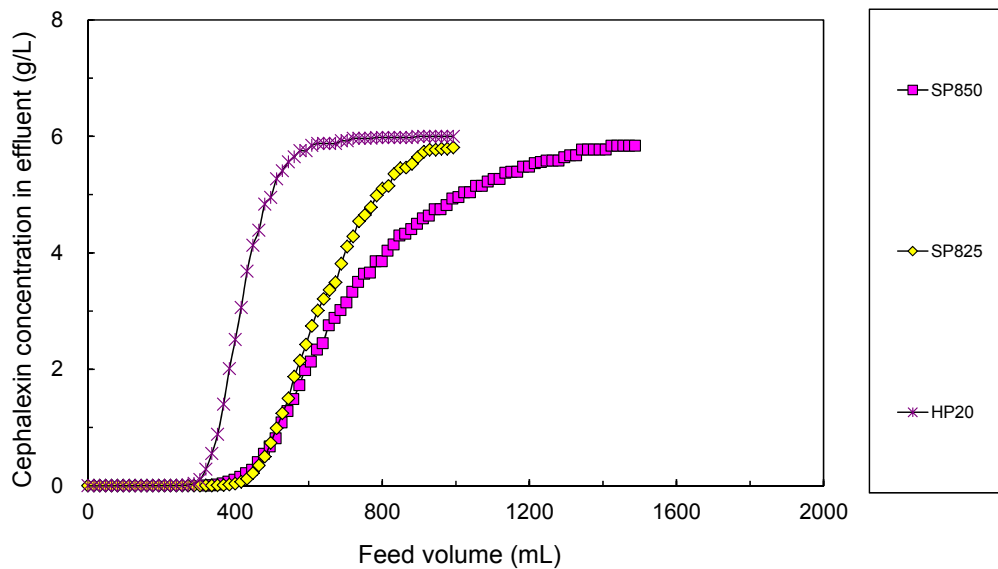


Figure 2-13. 細孔物性の異なるポリスチレン系合成吸着剤に対するセファレキシンの動的吸着挙動 (SV = 4 h⁻¹)

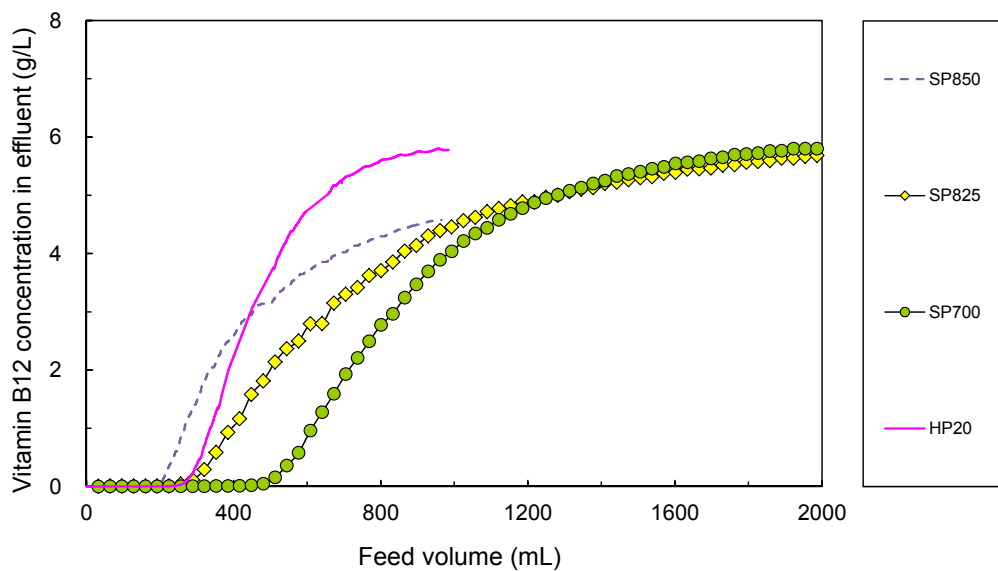


Figure 2-14. 細孔物性の異なるポリスチレン系合成吸着剤に対するビタミン B12 の動的吸着挙動 (SV = 4 h⁻¹)

単位体積当たりの比表面積が最も高い SP850 のセファレキシン総吸着量が最も大きかった。また、SP850 のセファレキシン溶出挙動は緩い勾配を示した (Figure 2-13)。SP850 は検討した 3 種のポリスチレン系合成吸着剤の中で細孔径が最も小さく、セファレキシンの細孔内部での拡散が遅くなるためであり、その結果、5 % BTC (p18 参照) については SP825 の 70 g/L に対して SP850 は 67 g/L と逆転が認められる。

また最も大きな細孔半径を有する HP20 の場合は、セファレキシンの細孔内拡散が速いためセファレキシン漏出勾配は最も大きく、細孔半径が大きい、すなわち単位体積当たりの比表面積が小さいためセファレキシンの漏出は最も速かった。

分子量が 1,355 でセファレキシンより大きいビタミン B12 の SP850, SP825, SP700 および HP20 に対する動的吸着挙動を Figure 2-14 に示した。その結果、細孔径が最も小さい SP850 はビタミン B12 の漏出が最も早かった。また、SP825 におけるセファレキシンとビタミン B12 の漏出挙動を比較するとビタミン B12 の方が緩い勾配を示した (Figure 2-13 と 2-14 の比較)。これは分子サイズが大きいビタミン B12 の細孔内での拡散速度が遅いことに起因していると考えた。

SP825 (細孔半径: 6.4 nm) と SP700 (細孔半径: 8.2 nm) は単位体積当たりの比表面積がほぼ同一であるが、SP700 からのビタミン B12 漏出が顕著に遅いことが明らかとなった。また、5 % BTC も SP825 の 48 g/L に対して SP700 は 82 g/L であり、大きな差異が認められた。これらの結果からも被吸着物質の分子サイズと合成吸着剤の細孔構造との組合せにより、動的吸着挙動に大きな差異が生じることが判明した。

次にポリスチレン系合成吸着剤 SP825 に対するセファレキシンとビタミン B12 の動的吸着挙動に及ぼす流速の影響を検討した (Figure 2-15)。

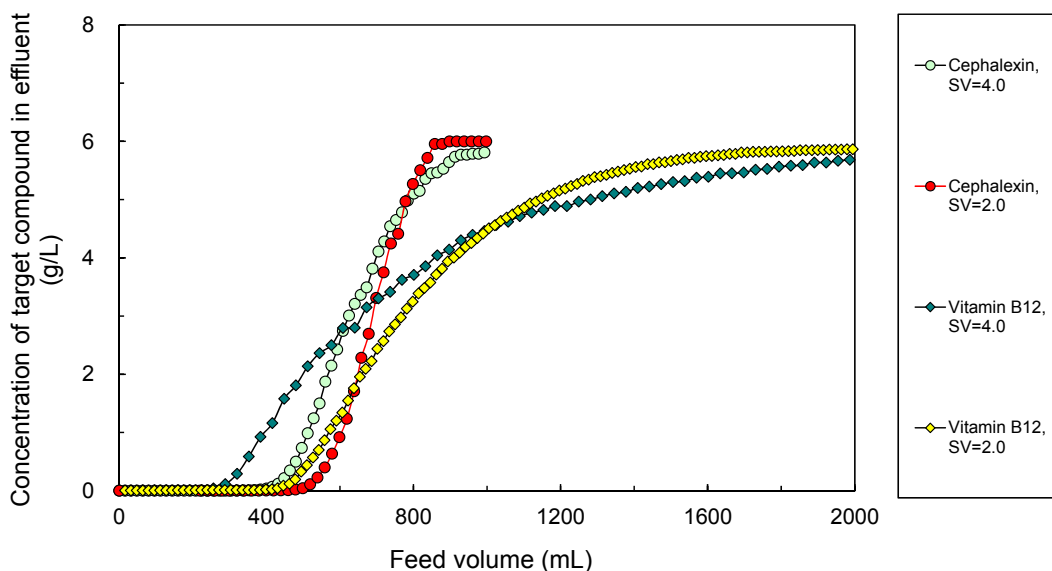


Figure 2-15. ポリスチレン系合成吸着剤 SP825 に対するセファレキシンおよびビタミン B12 の動的吸着挙動に及ぼす流速の影響

いずれも SV が 2 h^{-1} (平均流速: 1.33 mL/min) の方が吸着されずにカラム出口から漏出するタイミングが遅くなるが、その影響は分子量の大きなビタミン B12 の方がより明確である。これまでの知見と同様、被吸着物質の分子サイズが大きくなると合成吸着剤の細孔内部での拡散が遅くなり、また細孔径が小さくなるとその影響がより顕著になることから、動的吸着では流速の影響を大きく受けることが示された。

以上、合成吸着剤の化学的特性や物理的特性と平衡吸着量、動的吸着挙動についての包括的知見を得ることができた。

第三章 工業用合成吸着剤の順相系分離プロセスへの適用

第一節 研究の背景

工業用合成吸着剤は水溶性医薬品や機能性食品添加物の逆相系吸脱着工程やクロマトグラフィー工程に広く利用されるが、脂溶性医薬品や機能性食品添加物の製造工程では抽出溶媒や反応溶媒として非水溶性溶媒を使用することから、主としてシリカゲル系分離剤を使用した順相系吸脱着工程やクロマトグラフィー工程が採用される。

一方で、シリカゲル系分離剤を工業的製造プロセスへ適用する場合、シリカゲル系分離剤には製造ロット毎の品質安定性が低い、順相系移動相中の水分や極性不純物による分離挙動への影響が大きい、また酸・アルカリへの耐久性が低いことから溶離条件の適用範囲が狭い等の問題がある⁸⁾。

これに対して合成吸着剤はポリスチレン系、ポリメタクリル酸エステル系ともにシンプルな重合プロセスで製造されることから製造ロット毎の品質安定性が高い、また酸・アルカリへの耐久性が高く、長期間にわたり使用できるとともに広範囲な溶離条件が適用できる等、工業的分離プロセスに適した特性を有しているものの、その具体的適用例が少ないことから、著者は脂溶性医薬品や機能性食品添加物の順相系分離精製プロセスへの合成吸着剤適用事例の拡大検討を実施した。

第二節 合成吸着剤の順相系移動相における保持挙動

合成吸着剤の順相系クロマトグラフィー移動相に対する基本的保持挙動の把握を目的として、フタル酸ジアルキルエステル類の順相クロマトグラフィー評価を実施した。

クロマトグラフィー評価に使用した合成吸着剤の物理的特性を Table 3-1 に示す。

	型番 (現行型番)	種類	粒子径分布 (μm)	平均粒子径 (μm)	比表面積 (m^2/g)	細孔容積 (mL/g)	細孔半径 (nm)
1	CHP5C	ポリスチレン系	9-11	10	540	1.39	14.0
2	CHP2MG (CMG20/C10)	ポリメタクリル酸 エステル系	9-11	10	590	1.13	20.0
3	試作品	ポリメタクリル酸 エステル系	15-20	17	470	1.16	19.0
4	CHP2MGY (CMG20/P30)	ポリメタクリル酸 エステル系	25-35	31	510	1.15	23.0

Table 3-1. 順相クロマトグラフィー評価に使用した合成吸着剤の物理的特性

ここで、CHP5C (学術論文執筆当時、現在の後継品の型番は CHP20/C10)は、ポリスチレン系工業用合成吸着剤 HP20 (Table 2-1)と同一化学構造の、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)用に平均粒子径を $10 \mu\text{m}$ まで小粒子化したものであり、CHP2MG (学術論文執筆当時、現在の型番は CMG20/C10)と CHP2MGY (学術論文執筆当時、現在の型番は CMG20/P30)は、ポリメタクリル酸エステル系工業用合成吸着剤 HP2MGL (Table 2-1)と同一化学構造であり、平均粒子径をそれぞれ $10 \mu\text{m}$ 、 $31 \mu\text{m}$ まで小粒子径化したものである。

ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用し、アルキル鎖長の異なるフタル酸ジアルキルエステルのヘキサン/イソプロパノール系溶離液での HPLC 分析から得られたイソプロパノール濃度とフタル酸ジアルキルエステル類の保持係数 (capacity factor)との関係を Figure 3-1 に示した。極性の高いイソプロパノール濃度が高くなると保持係数が小さくなり、フタル酸ジアルキルエステルのアルキル鎖長が長いほど保持係数が小さくなることから、このクロマトグラフィー系は順相系であることが判明した。

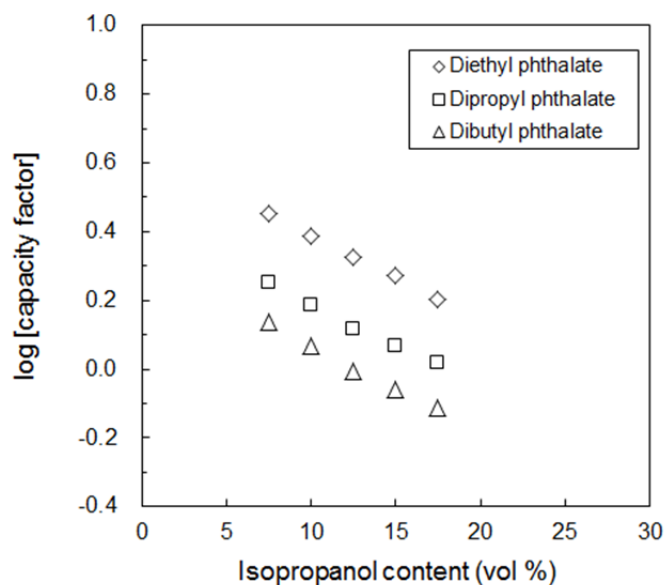


Figure 3-1. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用したヘキサン／イソプロパノール系溶離液でのフタル酸ジアルキルエステル類のクロマトグラフィー保持挙動に対するイソプロパノール濃度の影響

Figure 3-2 にポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG、ポリスチレン系合成吸着剤 CHP5C および比較対象としたシリカゲル Ultrasphere Si を使用した HPLC 分析 (ヘキサン／イソプロパノール = 90/10)でのフタル酸ジアルキルエステル類の保持係数を示した。同一溶離条件でのフタル酸ジアルキルエステル類の保持係数はポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の方がポリスチレン系合成吸着剤より大きい。これはポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤のエステル構造によりポリスチレン系合成吸着剤より極性が高くなることに起因するものと考察している。また、典型的シリカゲル分離剤と比較してポリスチレン系合成吸着剤は保持が弱く、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤は保持が強い。

これらの結果より、保持力が強いポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用する

ことでシリカゲル系分離剤より広範囲な溶離条件を設定できるとともに、シリカゲル系分離剤では吸着が強すぎる化合物の分離精製に保持力の弱いポリスチレン系合成吸着剤が適用できることが示唆された。

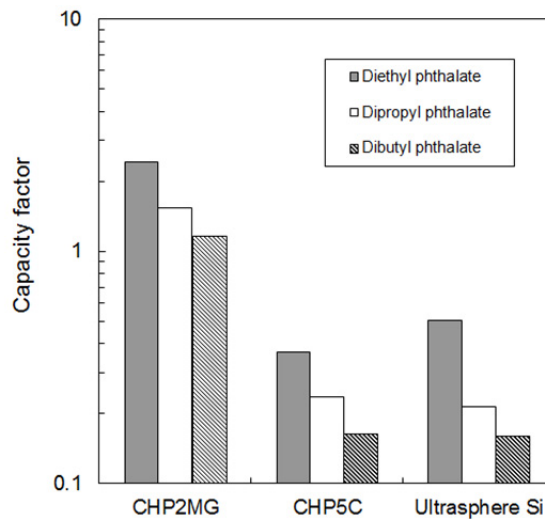


Figure 3-2. 各種分離剤によるフタル酸ジアルキルエステル類の順相クロマトグラフィー保持係数

以上の結果より、順相系吸脱着プロセスや順相系クロマトグラフィープロセスに合成吸着剤が適用できる、またポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤とポリスチレン系合成吸着剤のシリカゲル系分離剤に対する相対的な保持力の差異により、広範囲な化合物への対応が可能であると考えられる。

第三節 不飽和脂肪酸の分離精製

不飽和脂肪酸は天然油脂を構成する化合物であり、食餌療法など医学的にも重要なことから様々な不飽和脂肪酸に関する研究が実施されており、不飽和脂肪酸の効率の良い

分離精製は研究的側面とともに工業的にも強く求められている。

不飽和脂肪酸のクロマトグラフィー分離には生シリカゲル (bare silica gel)やこれに銀イオンを担持したもの、あるいは、アルキル基結合型シリカゲル等のシリカゲル系分離剤が用いられているが、合成吸着剤の適用例は少ない。

ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 **CHP2MG** を使用したアルキル鎖長が同一で不飽和二重結合数の異なるステアリン酸 (不飽和二重結合数: 0)、リノール酸 (不飽和二重結合数: 2)および γ -リノレン酸 (不飽和二重結合数: 3)の順相 HPLC クロマトグラムを Figure 3-3 に示す。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 **CHP2MG** の使用により、不飽和二重結合数の増加による極性の増大に従い保持力が増大することが明らかとなった。

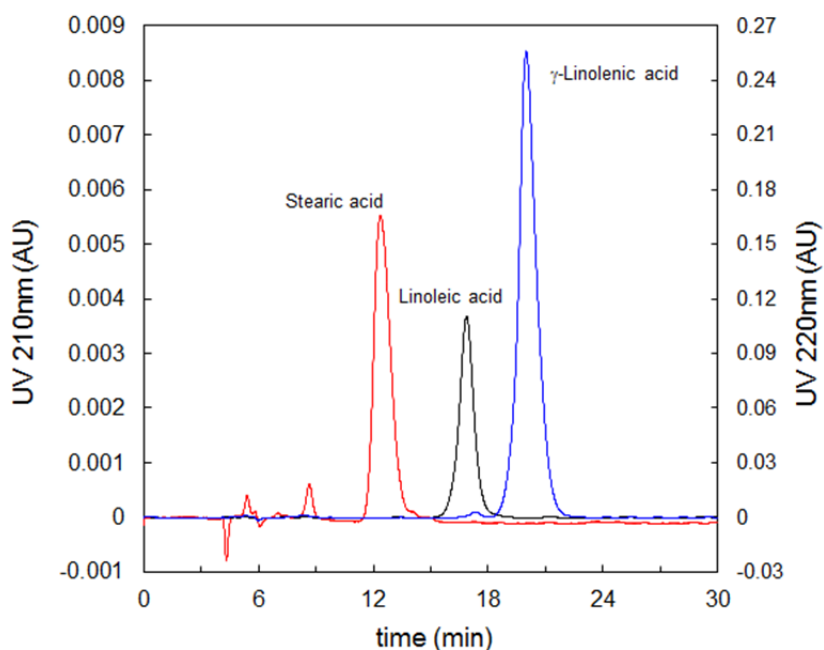


Figure 3-3. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 **CHP2MG** を使用した各種脂肪酸の順相系 HPLC クロマトグラム

第四節 生薬系化合物の分離精製

生薬から脂溶性生物活性物質を分離精製する場合には、溶媒抽出や液-液分配等の後にシリカゲル系分離剤を使った順相系分離精製工程が多用されている。今回、合成吸着剤の適用を検証するため、様々な粒子径のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用して朝鮮五味子 (*Schisandra chinensis*) 中のジベンゾシクロオクタジエンリグナン類の分離を検討した(Figure 3-4)。

朝鮮五味子果実抽出物中には schizandrin, gomisin A, gomisin N, wuweizisu C 等のジベンゾシクロオクタジエンリグナン類が存在する⁹⁾が、本研究では schizandrin に焦点を当てて評価した。平均粒子径が 10 μm 、17 μm および 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では、いずれも目的化合物である schizandrin を良好に分離できた。また、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を充填したカラムに対する通液流速をカラム断面積で除した値である「線流速 (Linear velocity)」を一定にし、カラム単位体積当たりの抽出物試料負荷量を固定することで、カラム長の異なる充填カラムでも同一プロファイルのクロマトグラムを得ることができた。この結果は、分析用途の平均粒子径の小さな合成吸着剤を充填した HPLC カラムで分離精製条件の検討を行い、その分離精製条件を活用して大型カラムに充填した粒子径の大きな合成吸着剤によるスケールの大きな分離精製の実施が可能であることを示している。

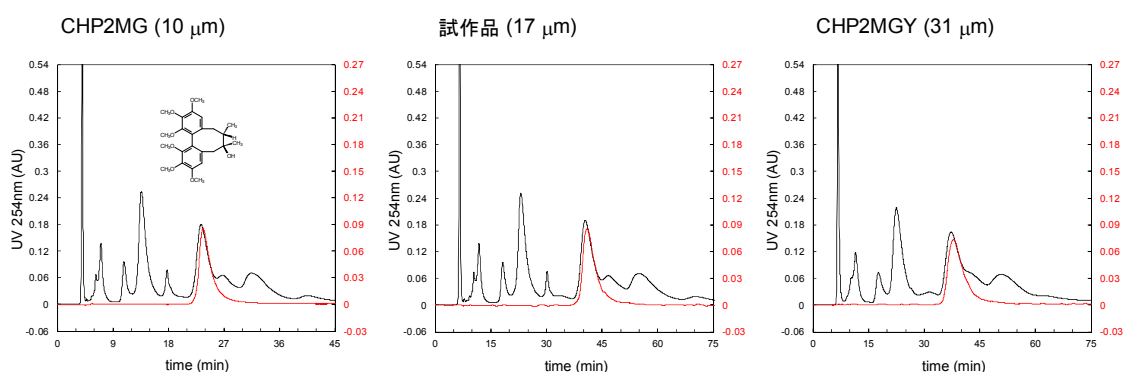


Figure 3-4. 様々な粒子径のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した朝鮮五味子果実ヘキサン抽出物および schizandrin の順相系 HPLC クロマトグラム

合成吸着剤を使用した順相系分離精製プロセスのスケールアップ適用性の更なる検証を目指して、内径 20 mm、長さ 500 mm の分取カラムに平均粒子径 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を充填して、様々な濃度の朝鮮五味子果実ヘキサン抽出物を順相系分取 HPLC 分離した(Figure 3-5)。

抽出物濃度を上げるにつれて各ピークの保持時間が短くなるとともに分離性は若干低下した。しかし、分離条件を検討した際の負荷量の 20 倍となる、樹脂 1 L に対して 3.3 g の負荷量でも同等のプロファイルのクロマトグラムを得られることが判明した。

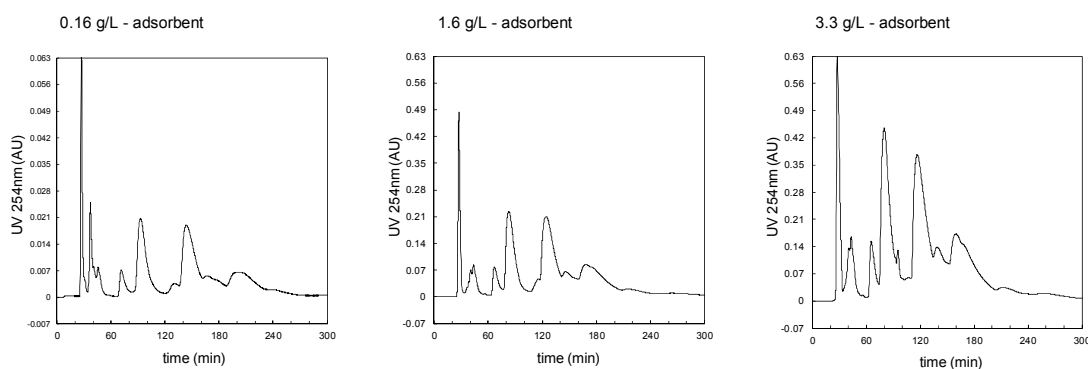


Figure 3-5. 平均粒子径 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した朝鮮五味子果実ヘキサン抽出物の順相系分取 HPLC クロマトグラム

第五節 トコフェロールおよびトコトリエノールの分離精製

トコフェロール (ビタミン E) は栄養素であり、天然系抗酸化剤でもあることから食品添加物として利用され、また生体内におけるフリーラジカル除去機能を指向して、ビタミン E 欠乏症の予防及び治療、末梢循環障害 (間歇性跛行症、動脈硬化症、静脈血栓症、血栓性静脈炎、糖尿病性網膜症、凍瘡、四肢冷感症) や過酸化脂質の増加防止¹⁰⁾ を目的として医薬品としても用いられている。

また、米油等に多く含有されるトコトリエノール(Figure 3-6)は、分子内にトリエン構造を保有するためトコフェロールより抗酸化力が強いとされており、機能性食品添加

物としての用途開発が進められている。

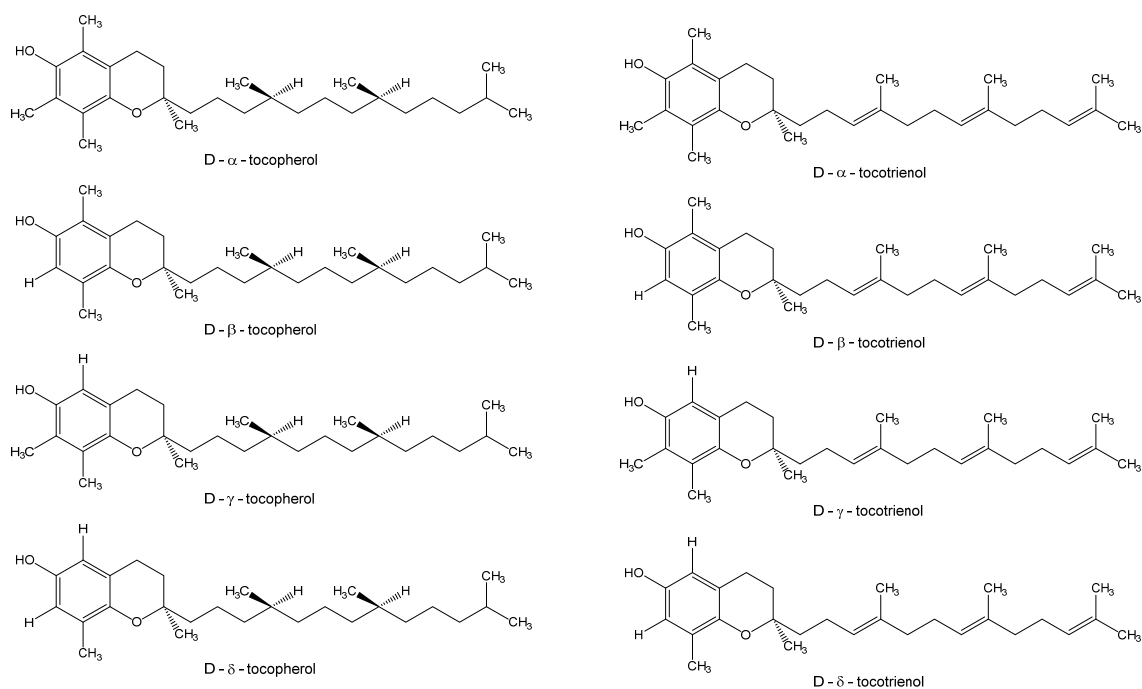


Figure 3-6. トコフェロールおよびトコトリエノールの化学構造

トコフェロールは大豆油スカム中のトコフェロールをアニオン交換樹脂で精製して製造されているが¹¹⁾、トコフェロールとトコトリエノールの分離精製工程では主としてシリカゲル系分離剤が用いられていたため合成吸着剤の適用性を検討した。

まず、ポリスチレン系合成吸着剤 **CHP5C** で米油由来の食品添加物である「オリザトコトリエノール **30G**」(オリザ油化製) 中のトコフェロールとトコトリエノールの順相系 **HPLC** 分離を実施したが、保持能力が低くトコフェロールとトコトリエノールの分離は達成されなかった。しかし、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 **CHP2MG** を使用したところ、トコフェロールとトコトリエノールを分離することができた。また、平均粒子径を $10\ \mu\text{m}$ 、 $17\ \mu\text{m}$ および $31\ \mu\text{m}$ のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用して **HPLC** クロマトグラムを採取したところ、平均粒子径が大きくても (**CHP2MGY**, $31\ \mu\text{m}$) ほぼ同一の分離挙動が得られることが判った(**Figure 3-7**)。更に平

均粒子径 31 μm の CHP2MGY を内径 20 mm、長さ 500 mm の分取サイズカラムに充填し、負荷量を樹脂 1 L あたり 4.1 g まで上げて、同等の分離が達成された(Figure 3-8)。

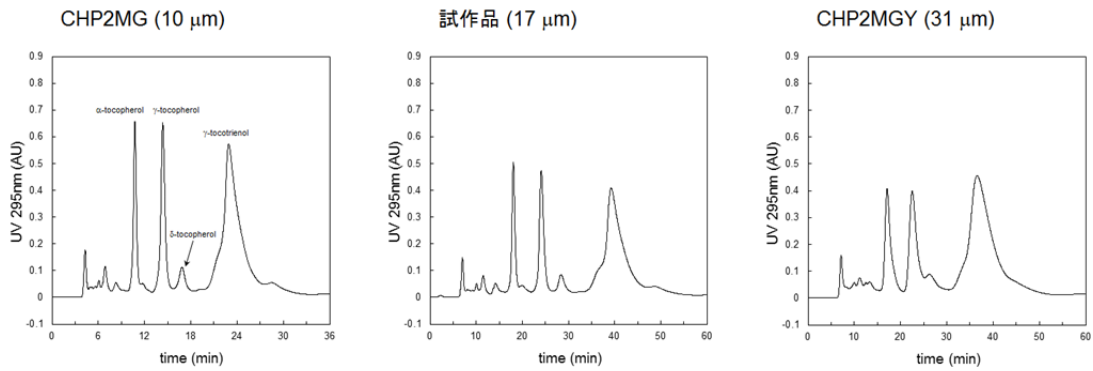


Figure 3-7. 粒子径が異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した米油由来トコフェロールおよびトコトリエノールの順相系 HPLC クロマトグラム

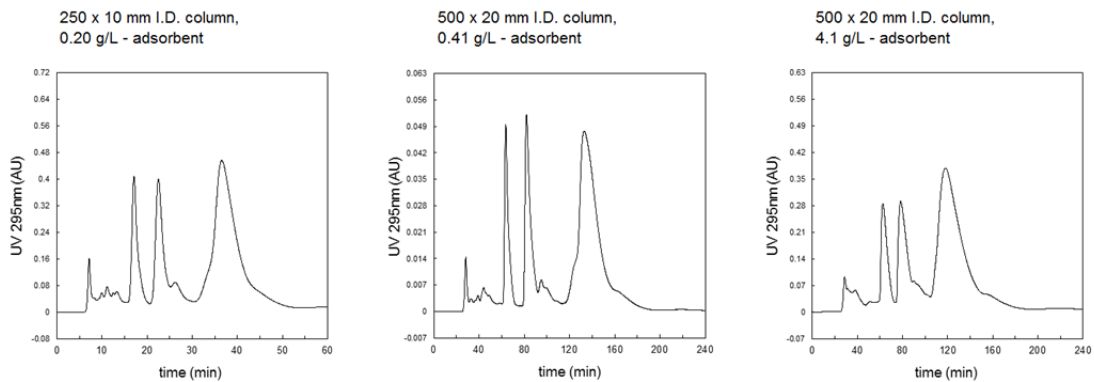


Figure 3-8. 平均粒子径 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤(CHP2MGY)を使用した米油由来トコフェロールおよびトコトリエノール抽出物の順相系 HPLC クロマトグラム

次に、トコフェロールとトコトリエノールの順相系 HPLC 分離に典型的に用いられるシリカゲル系分離剤との比較実験を行った(Figure 3-9)。

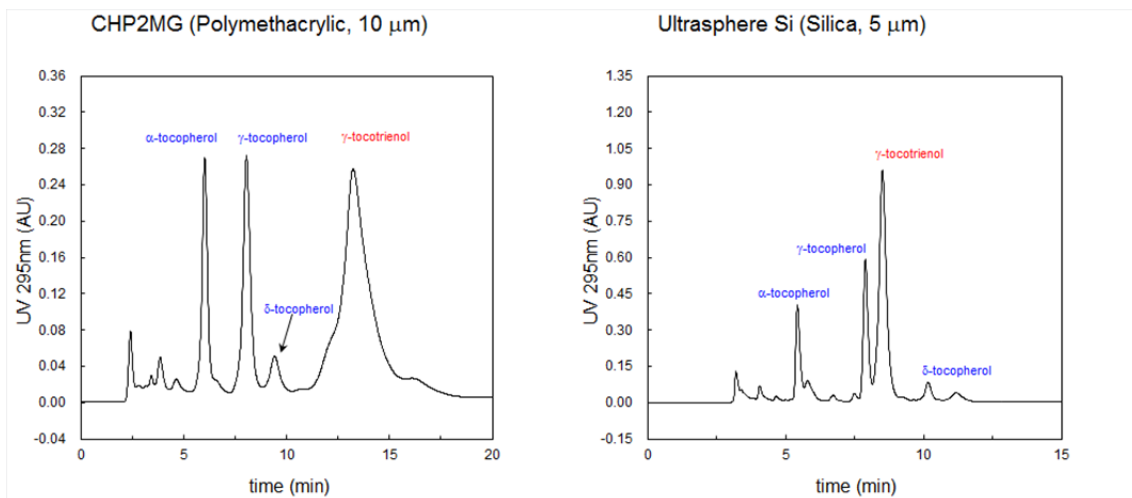


Figure 3-9. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤およびシリカゲル系分離剤を使用した米油由来食品添加物「オリザ トコトリエノール 30G」の順相系 HPLC クロマトグラム

また、Calbiochem・Novabiochem 社（学術論文執筆当時）製の各種トコフェロールおよびトコトリエノールを標品として、それぞれの保持係数を測定した。Figure 3-10 に示す通り、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した場合はトコフェロール群とトコトリエノール群との保持係数が大きく異なり、十分な分離が可能である。一方、シリカゲル系分離剤の場合はトコトリエノール群の保持係数が小さく、トコフェロール群とともに溶離されることから分離が困難であった。この理由として、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤中のエステル結合部位とトコトリエノールのトリエン構造との極性に基づく相互作用力がシリカゲル系分離剤に比べて強いためと考察している¹²⁾。

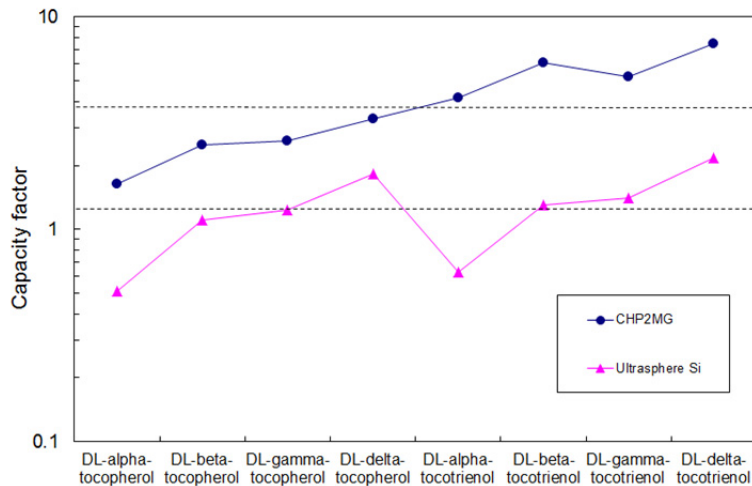


Figure 3-10. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤(CHP2MG)とシリカゲル系分離剤(Ultrasphere Si)を使用した各種トコフェロールおよびトコトリエノールの順相系クロマトグラフィー保持係数

第六節 コエンザイム Q10 の分離精製

コエンザイム Q10 (ユビキノン-10、ユビデカレノン) は生物の細胞内に広く存在し、電子伝達系の必須成分として重要な働きをしている。また、うつ血性心不全及び冠不全、栄養障害による筋ジストロフィーなどに有効であり、医薬品¹³⁾ や機能性食品添加物としても利用されている。

コエンザイム Q10 は、含有量が多い微生物の培養液から抽出する方法と化学合成法で調製されているが、培養法では不純物の除去工程でクロマトグラフィーが使用される。著者はコエンザイム Q10 とビタミン E の構造類似性に着目し、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を用いた順相系クロマトグラフィー法における保持挙動を検証した。

Figure 3-11 にポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用したコエンザイム Q10 とビタミン K1 およびビタミン K2 との順相 HPLC クロマトグラムを示し

た。ビタミン K1、ビタミン K2 およびコエンザイム Q10 の順に不飽和二重結合数に依存した極性増大に伴い、保持が強くなる。この結果も、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の順相系における分離プロセスへの適用性を示す事例である。

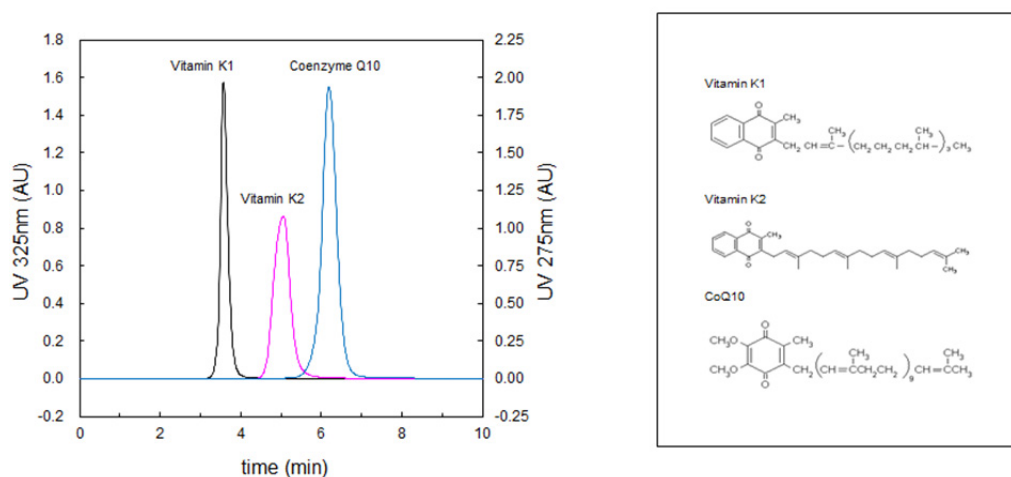


Figure 3-11. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用したコエンザイム Q10 とビタミン K1 およびビタミン K2 との順相 HPLC クロマトグラム

なお、本データを基盤として、培養法実機で生産されたコエンザイム Q10 のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した精密精製技術が確立された¹⁴⁾。

第七節 カプサイシノイド化合物の分離精製

カプサイシンに代表されるカプサイシノイド化合物は、エネルギー代謝促進作用、肥満抑制作用、免疫賦活作用等を示すことから、機能性食品添加物や温感パップ剤の薬効成分¹⁵⁾として使用されている。

一方、トウガラシの品種の一つである「CH-19 甘」などには、カプシエイト、ジヒドロカプシエイト、ノルジヒドロカプシエイト等のカプシノイド類と総称される辛味を呈しないカプサイシノイド様物質が存在し、カプサイシノイド類がほとんど含まれない¹⁶⁾。カプシノイド類にもカプサイシノイド類と同様の生理活性があり、辛味がないこと

から食品添加物としての適性に優れている。

これらの脂溶性を示すカプサイシノイド化合物の分離精製においても合成吸着剤の活用が期待されることから、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した順相系クロマトグラフィー法による保持挙動を検討した。

Figure 3-12 にカプサイシノイド類、カプシノイド類の構造式を示す。カプサイシノイド類は脂肪酸アミド誘導体であるが、カプシノイド類は脂肪酸エステル誘導体である。KOWWIN により計算された log K_{ow} (KOWWIN v1.68 estimate)の値はカプサイシンの 4.00⁵⁾、ジヒドロカプサイシンの 4.21⁵⁾に対してカプシエイトは 5.07⁵⁾、ジヒドロカプシエイトは 5.28⁵⁾ であり、順相系クロマトグラフィーにおいてカプシノイド類はカプサイシノイド類に対して保持能力の低下が予想される。

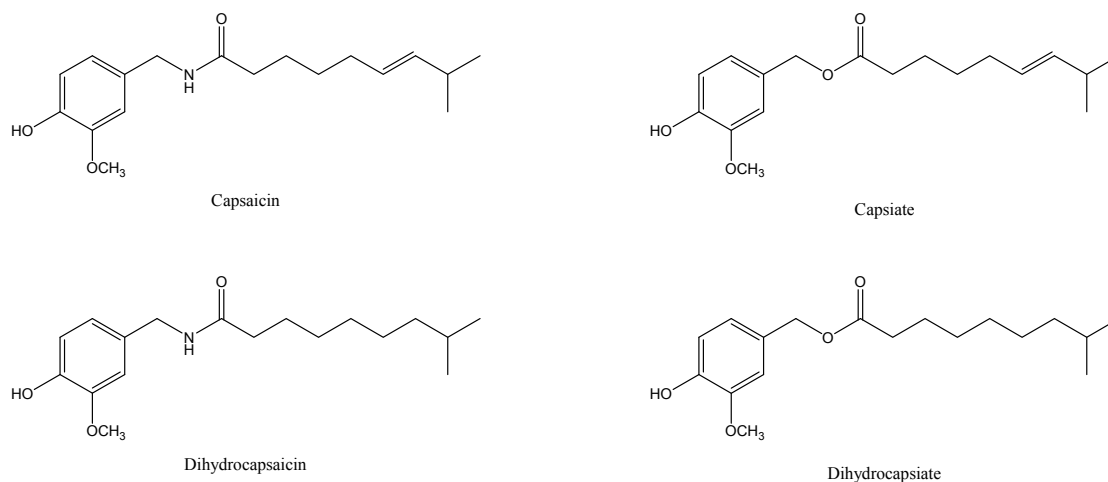


Figure 3-12. カプサイシノイド類およびカプシノイド類

Figure 3-13 にトウガラシ抽出物とカプサイシンおよびジヒドロカプサイシンのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用した順相 HPLC クロマトグラムを示した。

KOWWIN により計算された log Kow 値から予想できる様に、ジヒドロカプサイシンがカプサイシンより早く溶離した。また、トウガラシ抽出エキス中の赤色色素類はポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤との相互作用が弱いため溶離が早く、カプサイシノイド類との分離が容易であることも判明した。

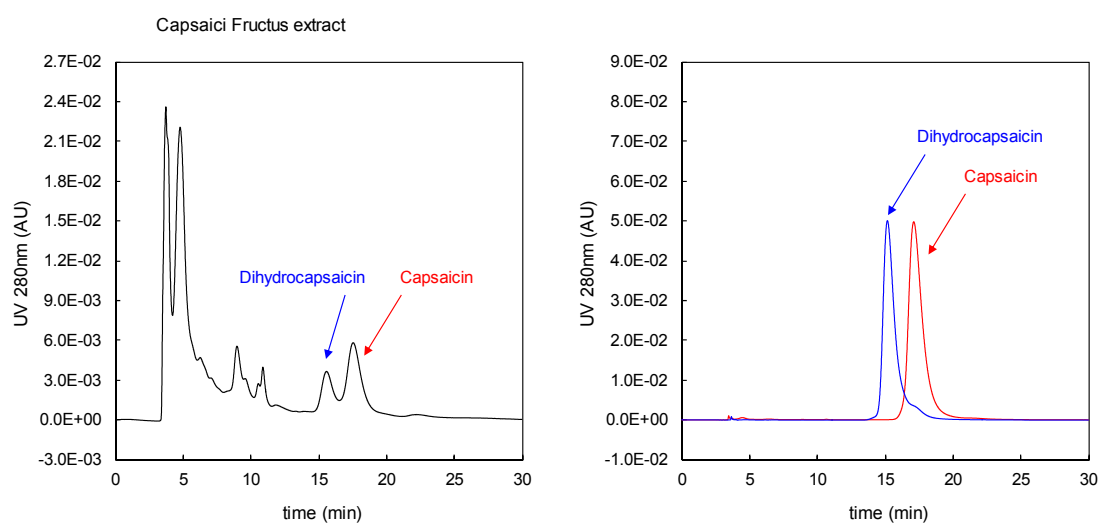


Figure 3-13. トウガラシ抽出物、カプサイシンおよびジヒドロカプサイシンのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤(CHP2MG)を使用した順相系 HPLC クロマトグラム

次に、カプシノイド類を含む市販健康食品のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用した順相 HPLC クロマトグラムの比較から(Figure 3-14)、ジヒドロカプシエイトとカプシエイトがそれぞれジヒドロカプサイシン、カプサイシンより早く溶離することが判明した¹⁷⁾。

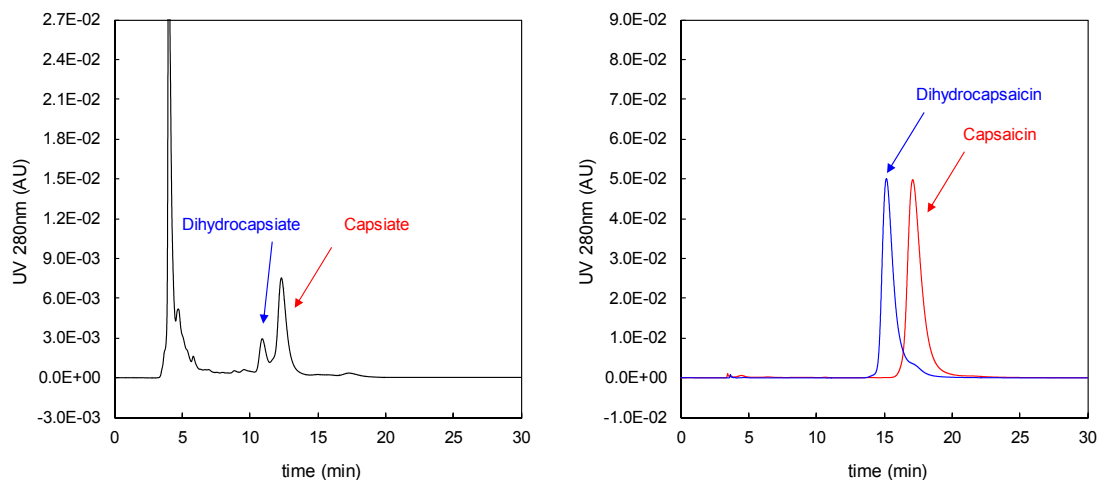


Figure 3-14. カプシノイド類含有健康食品のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 (CHP2MG)を使用した順相系 HPLC クロマトグラムとカプサイシノイド類の HPLC クロマトグラムとの比較

以上、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した順相系分離プロセスにより、構造の類似した化合物を不飽和二重結合の有無や保有数の違いにより発現するわずかな極性差に依存して分離出来ることが明らかになった。これらの知見は、複雑な構造の医薬品製造工程において求められる精密分離精製プロセスに対する解の一つとなり得るものと考えている。

第八節 アスタキサンチンの分離精製

アスタキサンチンは天然物由来のポリエン系カロテノイド類の一種で、魚類、鶏卵の色揚げ色素として広く使用されるとともに、油脂加工食品、タンパク質性食品、水性液状食品なども利用されている。さらに、脂質の過酸化に対する抗酸化活性を示し、 α -トコフェロールの数百倍に達する一重項酸素消去作用などを持つため、機能性食品、化粧品、医薬品¹⁸⁾としての用途が期待されている。

しかし、天然物由来のアスタキサンチン類抽出物には多数の夾雑物が含まれるため、

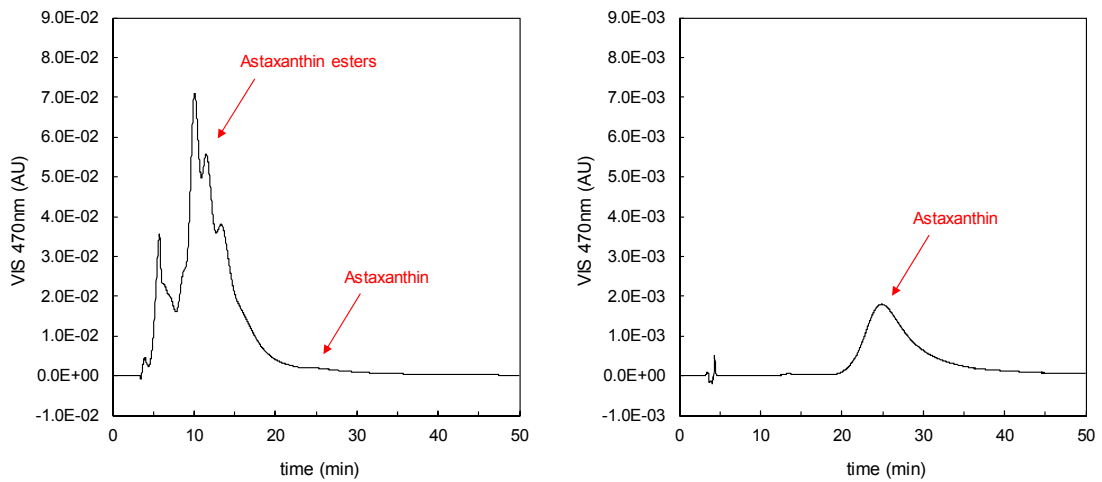


Figure 3-16. 市販ヘマトコッカス藻類抽出物（左）およびアスタキサンチン（右）のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を用いた順相 HPLC クロマトグラム

次に、市販ヘマトコッカス藻類抽出物を 0.02 M NaOH - メタノール溶液で、室温下にて 3 時間ケン化した後、特段の前処理を施すことなく反応液を直接ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG に注入して得られた順相 HPLC クロマトグラムを

Figure 3-17 に示す。

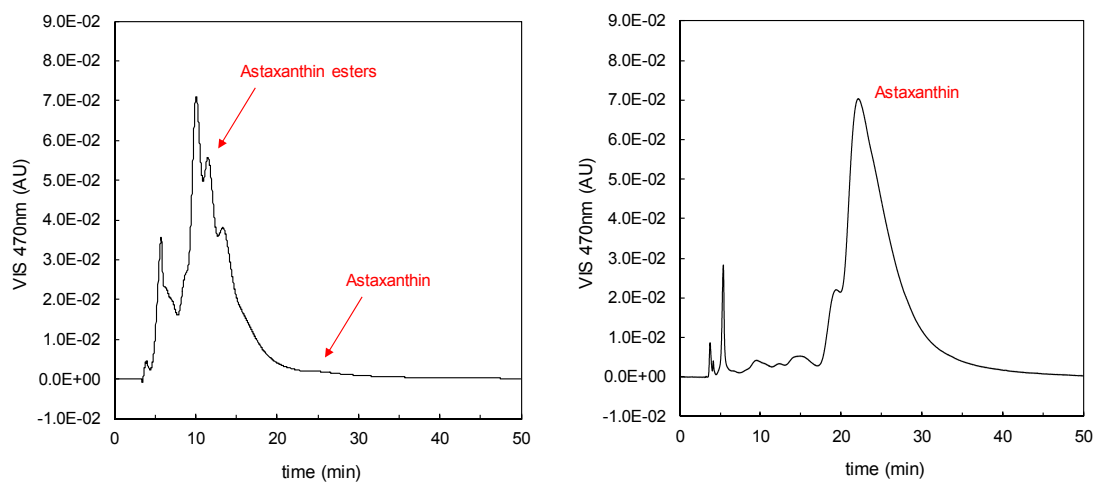


Figure 3-17. 市販ヘマトコッカス藻類抽出物（左）およびその 0.02M NaOH – MeOH

中でケン化した反応液（右）のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用した順相 HPLC クロマトグラム

市販ヘマトコッカス藻類抽出物をアルカリケン化した反応液のクロマトグラム (Figure 3-17 右)では、保持時間の短いアスタキサンチン脂肪酸エステル類のピークがほぼ消失し、市販ヘマトコッカス藻類抽出物溶液のクロマトグラム(Figure 3-17 左)と比較して遊離アスタキサンチンのピークが増大している。

ケン化反応に用いた水酸化ナトリウムは合成吸着剤と相互作用しないのでクロマトグラフィー分離工程の初期に充填カラムから溶出しており、アスタキサンチンピークの溶離時には存在しない。なお、0.02 M の NaOH – MeOH 溶液を通じると、シリカゲル系分離剤の場合には基材が溶解する可能性が高いが、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では問題のないレベルである。

以上、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用してヘマトコッカス藻類抽出物からアスタキサンチン脂肪酸エステル類と遊離アスタキサンチンを分離精製できることが明らかとなった。また、アスタキサンチン脂肪酸エステル類のケン化反応液をポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤に直接負荷することが可能であり、かつ、苛性アルカリの除去と遊離アスタキサンチンの分離精製を同時に行うことが可能であることも判明した²⁰⁾。

特に苛性アルカリの除去と化合物の分離精製を同時に実施できることは、化学的耐性に優れた合成吸着剤の特徴的な使用方法である。この方法を適用して生薬由来成分である Onjisaponin A, E, F, G (Figure 3-18)混合物のアルカリ加水分解反応液をポリスチレン系合成吸着剤 HP20 に直接負荷し、苛性アルカリの除去後に反応生成物である Tenuifolin (Figure 3-19)が分離精製された事例が報告されている²¹⁾。

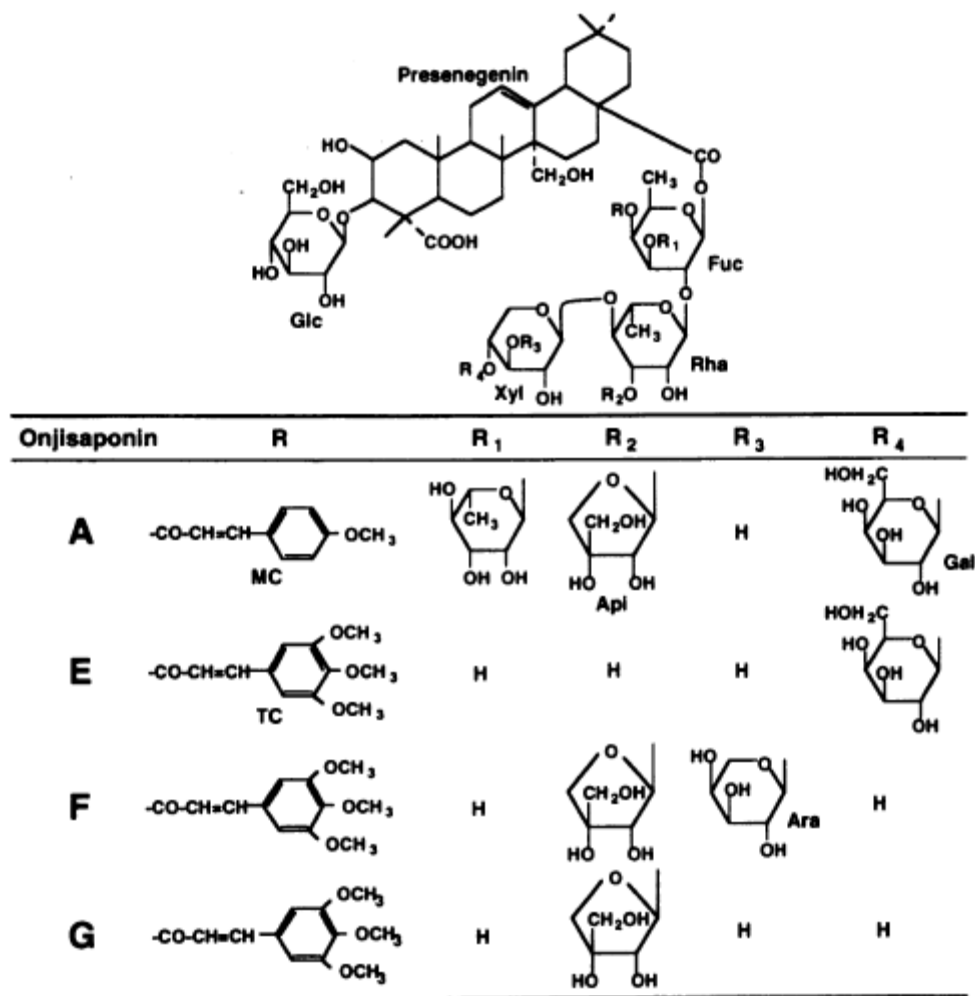


Figure 3-18. Onjisaponin A, E, F, G の化学構造

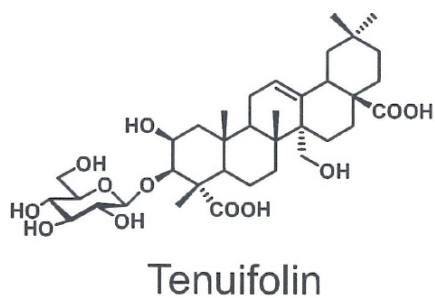


Figure 3-19. Tenuifolin の化学構造

第四章 合成吸着剤のクロマトグラフィー分離挙動の特性化

第一節 研究の背景

第三章では、合成吸着剤が医薬品や機能性食品添加物の分離精製プロセスへの適用性が高く、またシリカゲル系分離剤とは異なる分離特性や化学的耐性などの優れた特徴を有することを示した。

しかし、クロマトグラフィープロセスに合成吸着剤を適用する際に、分析に広く用いられるシリカゲル系分離剤とは異なる分離挙動を有するため、条件検討に時間がかかるとともに条件最適化が難しいなどの課題があることから、プロセス化学者への指標提示を目的として、合成吸着剤のクロマトグラフィー分離挙動の特性化を検討した。

第二節 低分子化合物の保持挙動

クロマトグラフィー法において、分離剤の保持挙動の特性化については多くの検討が行われているが、本研究では M. H. Abraham, P. W. Carr らが提唱した Linear Solvation Energy Relationships (LSER) 法を基本とした簡易的評価により各種合成吸着剤を特性化した。

LSER 法において、クロマトグラフィープロセスにおける対象化合物の保持係数と該当化合物の特性値との関係は以下の式にて記述される²²⁾。

$$\log k' = \log k'_0 + vV_2 + s\pi_2^* + a\Sigma\alpha_2^H + b\Sigma\beta_2^H + rR_2$$

- V_2 : solute's molecular volume
- π_2^* : dipolarity / polarizability
- $\Sigma\alpha_2^H$: solute's overall hydrogen bond acidity
- $\Sigma\beta_2^H$: solute's overall hydrogen bond basicity
- R_2 : excess molar refraction

従って、各パラメーター既知の化合物の保持挙動の測定と解析により、 v, s, a, b, r を求めることで分離剤の特性を記述するパラメーター値が得られる。

Table 4-1 に M. H. Abraham, P. W. Carr らが提示した様々な官能基を保有する化合物とそれらの特性値を示す²²⁻²⁵⁾。これらの化合物について小粒子径合成吸着剤と、比較対象としたオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤を充填した HPLC カラムを使用して、アセトニトリル/水 = 50 / 50 溶離液系による逆相系 HPLC 法でのクロマトグラムを採取し、保持データを解析して各分離剤に固有のパラメーター値を得た。

ポリスチレン系合成吸着剤 CHP5C と PRP-1²²⁾、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG と、比較対象としたオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤である YMC Pro C18 あるいは Zorbax Stable Bond C18²⁶⁾について得られたパラメーター値 v, s, a, b, r の中で、逆相クロマトグラフィー保持の基本である疎水性相互作用の主要因となる化合物の分子容積 V_2 にかかる係数 v で s, a, b, r を除した値を Table 4-2 に示した。

合成吸着剤に特徴的なパラメーター値として、オクタデシル基結合型シリカゲル分離剤では殆どゼロを示す r/v が大きい正の値となることがあげられる。 R_2 は、分離剤の極性を表す π_2^* を補正するパラメーターであり、分離剤および溶離液により構成されるクロマトグラフィー系と化合物の π 電子または n 電子との相互作用の程度を反映した値²²⁾であることから、 R_2 にかかる係数 r がアルキル基結合型シリカゲル分離剤では殆どゼロになるが、芳香環を有するポリスチレン系合成吸着剤やエステル結合が共存するポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では大きな正の値を示す。

また、残りの 3 因子は主に官能基に吸着された移動相に起因する²²⁾ことから、分離剤表面にアルキル基がブラシ状に存在するアルキル基結合型シリカゲル分離剤とは異なり、表面に官能基がない合成吸着剤では大きな負の値を示す傾向があることが判明した。

化合物	Mw	V ₂	π_2^*	$\Sigma\alpha_2^H$	$\Sigma\beta_2^H$	R ₂
Benzamide	121.14	0.9720	1.50	0.49	0.67	0.990
N-Benzylformamide	135.17	1.1137	1.80	0.40	0.63	0.990
Acetanilide	135.17	1.1130	1.40	0.50	0.67	0.870
Benzyl alcohol	108.14	0.9160	0.87	0.33	0.56	0.803
Phenol	94.11	0.7751	0.89	0.60	0.30	0.805
<i>p</i> -Nitrobenzyl alcohol	153.14	1.0900	1.39	0.44	0.62	1.064
3-Phenylpropanol	136.19	1.1978	0.90	0.30	0.67	0.821
<i>p</i> -Chlorophenol	128.56	0.8975	1.08	0.67	0.20	0.915
Acetophenone	120.15	1.0139	1.01	0.00	0.48	0.818
Benzonitrile	103.12	0.8711	1.11	0.00	0.33	0.742
Nitrobenzene	123.11	0.8906	1.11	0.00	0.28	0.871
Methylbenzoate	136.15	1.0726	0.85	0.00	0.46	0.733
Anisole	108.14	0.9160	0.75	0.00	0.29	0.708
<i>p</i> -Nitrotoluene	137.14	1.0315	1.11	0.00	0.28	0.870
<i>p</i> -Nitrobenzyl chloride	171.58	1.1539	1.34	0.00	0.40	1.080
Toluene	92.14	0.8573	0.52	0.00	0.14	0.601
Ethylbenzene	106.16	0.9982	0.51	0.00	0.15	0.613
<i>p</i> -Xylene	106.16	0.9982	0.52	0.00	0.16	0.613
Bromobenzene	157.01	0.8914	0.73	0.00	0.09	0.882
Benzophenone	182.22	1.4808	1.50	0.00	0.50	1.447
<i>p</i> -Dichlorobenzene	147.00	0.9612	0.75	0.00	0.02	0.825
Propylbenzene	120.19	1.1391	0.50	0.00	0.15	0.604
Naphthalene	128.17	1.0854	0.92	0.00	0.20	1.340
Butylbenzene	134.22	1.2800	0.51	0.00	0.15	0.600

Table 4-1. 合成吸着剤のクロマトグラフィー保持挙動の特性化に用いた化合物

分離剤	種類	<i>s/v</i>	<i>a/v</i>	<i>b/v</i>	<i>r/v</i>
CHP5C	ポリスチレン系 合成吸着剤	-0.23	-0.53	-1.26	0.27
PRP-1 ²²⁾	ポリスチレン系 合成吸着剤	-0.29	-0.70	-1.40	0.36
CHP2MG	ポリメタクリル酸エ ステル系合成吸着剤	-0.30	-0.32	-1.75	0.58
YMC Pro C18	アルキル基結合型 シリカゲル分離剤	-0.20	-0.25	-1.04	0.01
Zorbax Stable Bond C18 ²⁶⁾	アルキル基結合型 シリカゲル分離剤	-0.20	-0.33	-1.11	0.00

Table 4-2. 合成吸着剤およびオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤の特性値

第三節 トコフェロールおよびトコトリエノールの分離挙動

第二節で合成吸着剤ではアルキル基結合型シリカゲル分離剤とは異なり、化合物の π 電子または n 電子との相互作用がクロマトグラフィー保持挙動に特徴的に作用することが明らかとなった。

第三章第五節でポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を用いたトコフェロールとトコトリエノールの分離精製について詳述したが、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤でトコフェロール群とトコトリエノール群の保持に大きな差が生じる要因として、トコトリエノール群に存在するトリエン構造に由来する π 電子と合成吸着剤との相互作用が強く働いたことがあげられる。一方、シリカゲル分離剤では不飽和二重結合に対する相互作用が弱いためトコフェロール群とトコトリエノール群との保持に大きな差

がなく、分離能が低くなつたと考えれば合理的である。

第四節 ステロイド系化合物の分離挙動

第三節で、順相系でのトコフェロール群とトコトリエノール群のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の分離挙動を考察したが、逆相系の適用事例として、ステロイド系化合物 19-Nortestosterone, Testosterone, 19-Norethisterone および Levonorgestrel (Figure 4-1)を対象とした逆相 HPLC 評価を実施した。

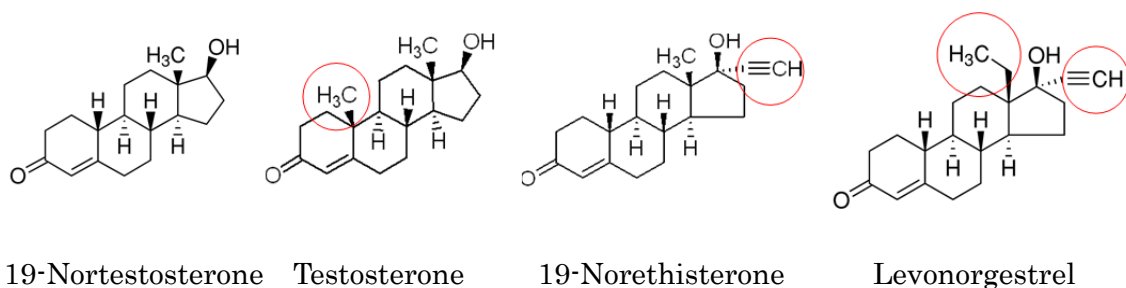


Figure 4-1. 逆相系 HPLC 評価に用いたステロイド系化合物

ポリスチレン系合成吸着剤 CHP20/C10 (CHP5C の後継品)、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CMG20/C10 (CHP2MG の型番変更品) と比較対象としたオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤 Phenomenex Luna C18 (2)を使用した同一溶離液での逆相 HPLC クロマトグラム(Figure 4-2)では、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤は、オクタデシル基結合型シリカゲル分離剤と同程度の保持を示しステロイド系化合物の保持が全体的に弱かった。ポリスチレン系合成吸着剤はステロイド系化合物の保持が強だけでなく、分子内に三重結合基を保有する 19-Norethisterone と Levonorgestrel の保持が強いことが判明した。

この結果は、第二節で明らかとなった合成吸着剤の特徴である化合物の π 電子または n 電子との相互作用を反映していることから、目的化合物と除去対象となる構造類似不

純物に π 電子または n 電子の差があれば、合成吸着剤による分離精製の可能性が高くなると考えられる。

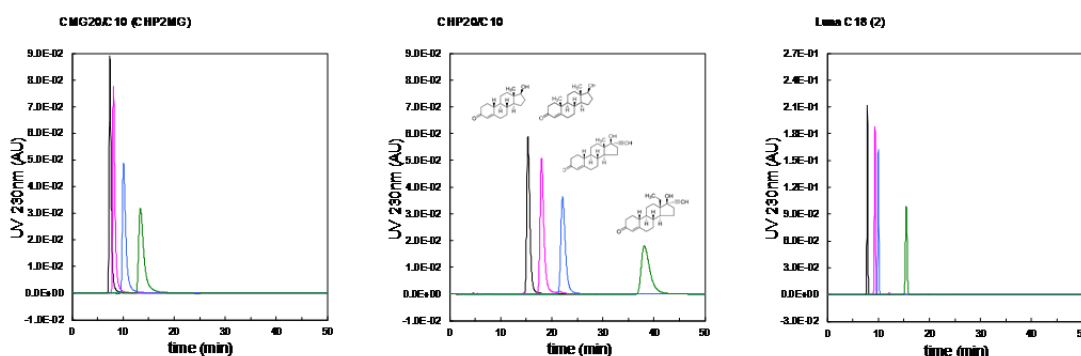


Figure 4-2. 各種合成吸着剤とオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤を使用したステロイド化合物の逆相系 HPLC クロマトグラム

第五節 ポリエン系抗生物質の分離挙動

合成吸着剤の特徴である化合物由来の π 電子または n 電子との相互作用による分離効率の向上を期待してポリエン系抗生物質であるナイスタチン、アムホテリシン B とフィリピン(Figure 4-3)を選択して逆相系 HPLC による分離を検討した。

二重結合の数はフィリピンが 5 つ、ナイスタチンが 6 つ、アムホテリシン B が 7 つであるが、ナイスタチンとアムホテリシン B にはデオキシアミノ糖である D-ミコサミンが結合しており、疎水性相互作用による保持力は弱くなるものと予想される。一方、ナイスタチンとアムホテリシン B の構造差は二重結合数の他は水酸基の位置の違いであり、分子全体の疎水性差は少ないものと考えられる (KOWWIN v1.68 により求められたナイスタチンの $\log Kow$ は-3.33⁵⁾、アムホテリシン B の $\log Kow$ は-3.54⁵⁾、フィリピンの $\log Kow$ は 0.87⁵⁾)。

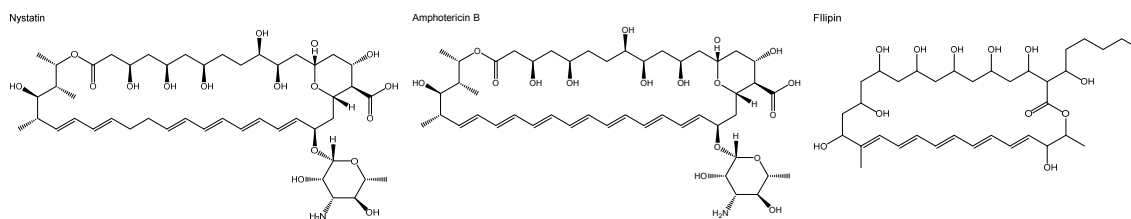


Figure 4-3. ポリエン系抗生物質

ポリスチレン系合成吸着剤 CHP20/C10 と、比較対象としたオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤 Phenomenex Luna C18 (2)を使用した逆相系 HPLC クロマトグラムで、いずれの分離剤もフィリピンに対する保持力が強く、他の 2 化合物と良好に分離できたが、ナイスタチンとアムホテリシン B の分離では、オクタデシル基結合型シリカゲル分離剤は保持位置が殆ど同じため分離不可能であった。一方、ポリスチレン系合成吸着剤の場合にはヘプタエンであるアムホテリシン B の保持がヘキサエンであるナイスタチンより強くなり分離することができた(Figure 4-4)。

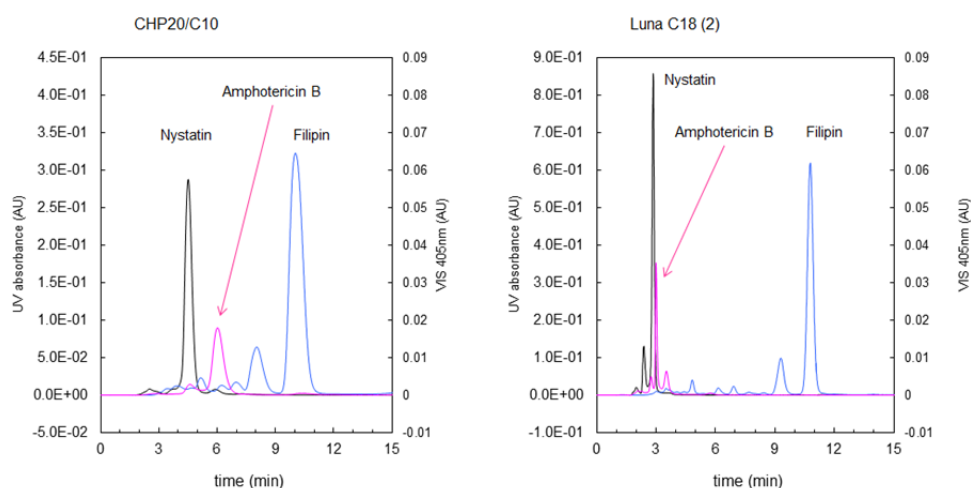


Figure 4-4. ポリスチレン系合成吸着剤およびオクタデシル基結合型シリカゲル分離剤を使用したポリエン系抗生物質の逆相系 HPLC クロマトグラム

以上の結果から、化合物の π 電子または n 電子と合成吸着剤の強い相互作用を効率的に利用することで、医薬品や機能性食品添加物の精密分離精製が可能性となることが示された。この結果を応用して、海洋バクテリア由来のポリエン系化合物である 4, 4' - diapolycopene - 4, 4' - dioic acid (Figure 4-5)が、平均粒子径 100 μm のポリスチレン系合成吸着剤 HP20SS と平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤 CHP20/C10 を充填した HPLC カラムで分離精製された事例が報告されている²⁷⁾。

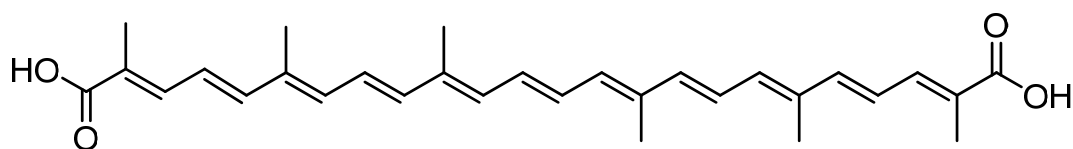


Figure 4-5. 4, 4' - diapolycopene - 4, 4' - dioic acid の化学構造

第五章 医薬品・機能性食品添加物の高度精製用合成吸着剤の開発

第一節 研究の背景

合成吸着剤は、低分子化合物から中分子化合物までの医薬品や機能性食品添加物の分離精製プロセスに好適に適用可能であり、逆相系吸脱着プロセスやクロマトグラフィープロセスだけでなく順相系吸脱着プロセス、クロマトグラフィープロセスにも使用できること、更に、合成吸着剤の化学構造に起因するユニークな保持挙動を活用すれば、シリカゲル系分離剤では困難な物質の分離も可能となることを示した。

合成吸着剤は、古くは、セファロスポリン C、ビタミン B12 やインスリン等の医薬品や天然色素、ステビア甘味料等の機能性食品添加物の分離精製プロセスに用いられてきたが²⁾、近年の薬学、食品化学の発展に伴い分離精製プロセスも高度化するとともに複雑化し、分離剤に対する要求レベルも高くなっている。

生産量は比較的少ないものの高度な分離性能が求められる医薬品や機能性食品添加物の精密分離精製プロセスへの適用を目的として、従来から工業的に用いられてきた 100 μm ~ 500 μm より小粒子径の合成吸着剤を新たに開発した。

具体的には粒子径 20 μm および 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤と、粒子径 30 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の商品化を実施し、工業用合成吸着剤および HPLC 分析カラムとして上市している粒子径 10 μm の従来の合成吸着剤との分離性能を比較した。

第二節 小粒子径合成吸着剤の開発

異なる粒子径のポリスチレン系およびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の製造方法を検討し、様々な重合条件を最適化することで工業的スケールでの製造を可能とするとともに、需要面の判断で粒子径 20 μm と 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤と

粒子径 30 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を商品化した。

粒子径の異なるポリスチレン系合成吸着剤とポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の特性を試作品とともに纏めた(Table 5-1, 5-2)。

	型番 (現行型番)	種類	粒子径分布 (μm)	平均粒子径 (μm)	比表面積 (m^2/g)	細孔容積 (mL/g)	細孔半径 (nm)
1	CHP5C	ポリスチレン系	9-11	10	540	1.39	14.0
2	CHP55A (CHP50/P20)	ポリスチレン系	15-25	18	580	1.54	14.0
3	CHP55Y (CHP50/P30)	ポリスチレン系	25-35	10	590	1.55	14.0
4	CHP20P (CHP20/P50)	ポリスチレン系	37-75	55	520	1.17	30.0
5	SP20SS	ポリスチレン系	63-75	70	560	1.40	30.0
6	HP20SS	ポリスチレン系	63-150	100	540	1.35	30.0
7	HP20	ポリスチレン系	200-600	440	580	1.30	30.0
8	HP21	ポリスチレン系	200-600	440	630	1.39	12.0

Table 5-1. 粒子径の異なるポリスチレン系合成吸着剤

	型番 (現行型番)	種類	粒子径分布 (μm)	平均粒子径 (μm)	比表面積 (m^2/g)	細孔容積 (mL/g)	細孔半径 (nm)
1	CHP2MG (CMG20/C10)	ポリメタクリル酸 エステル系	9-11	10	590	1.13	20.0
2	試作品	ポリメタクリル酸 エステル系	15-20	17	470	1.16	19.0
3	CHP2MGY (CMG20/P30)	ポリメタクリル酸 エステル系	25-35	31	510	1.15	23.0
4	試作品	ポリメタクリル酸 エステル系	63-150	115	520	1.28	29.0
5	HP2MG	ポリメタクリル酸 エステル系	200-600	490	560	1.16	20.0

Table 5-2. 粒子径の異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤

次に、粒子径 $20\ \mu\text{m}$ および $30\ \mu\text{m}$ のポリスチレン系およびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の $25\ ^\circ\text{C}$ における水の通液線速度と圧力損失を測定したところ(Figure 5-1)、通液線速度と圧力損失には、 $1\ \text{MPa}/\text{m}$ を超えるまで直線的な関係が維持されており、線速度が上昇しても粒子の変形に起因する圧密化は生じなかった。従って、粒子径 $20\ \mu\text{m}$ および $30\ \mu\text{m}$ の合成吸着剤は工業的分離精製プロセスにおいて十分な力学的強度を有することが明らかとなった。

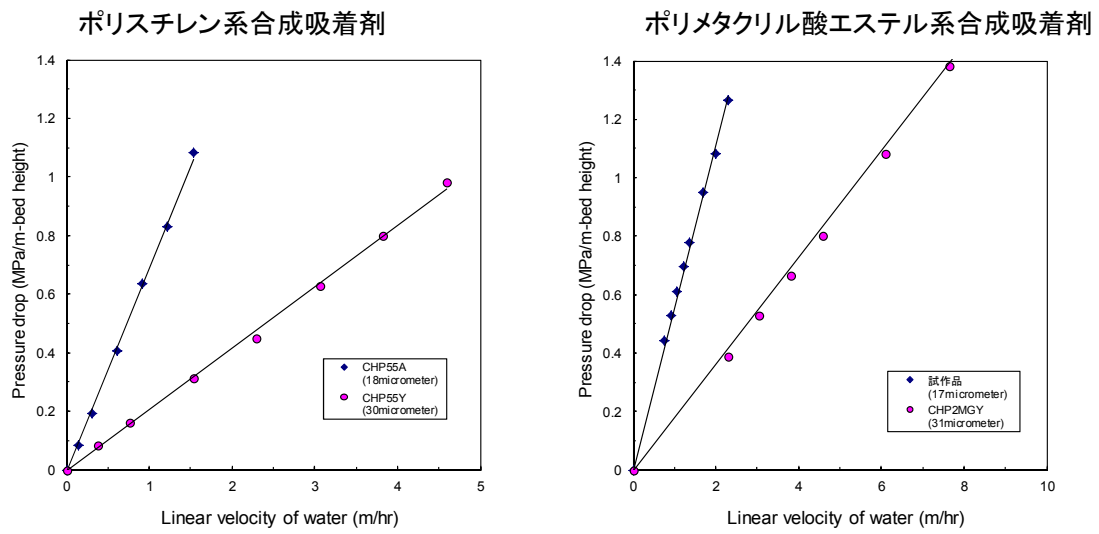


Figure 5-1. ポリスチレン系（左）およびポリメタクリル酸エステル系（右）合成吸着剤の水力学的特性（水、25 °C）

第三節 小粒子径合成吸着剤の分離性能検証

粒子径 20 μm および 30 μm の合成吸着剤と従来の工業用合成吸着剤および HPLC 分析カラムとして上市している粒子径 10 μm の合成吸着剤の分離性能を比較した。

平均粒子径が異なるポリスチレン系合成吸着剤の同一分離条件でのフタル酸ジアルキルエステル類の逆相系 HPLC 評価における保持係数を測定したところ(Figure 5-2)、平均粒子径が異なっても保持係数はほぼ同等であった。この結果により、フタル酸ジアルキルエステル類のように分子量が小さな化合物の分離においては、14 nm 以上の比較的大きな細孔半径を持つ合成吸着剤では、その差は化合物との相互作用効率にほとんど影響を及ぼさないことが示された。

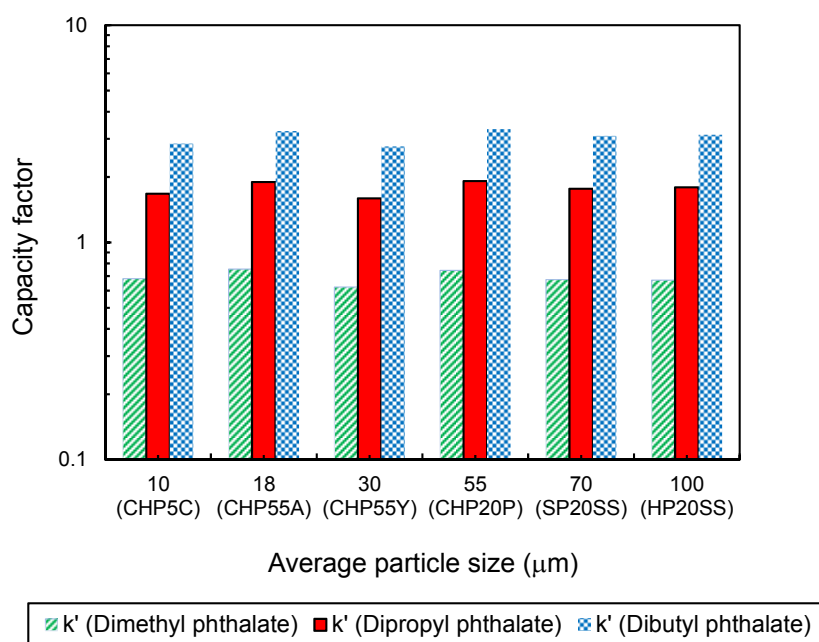


Figure 5-2. 様々な平均粒子径のポリスチレン系合成吸着剤のフタル酸ジアルキルエステル類の逆相系 HPLC における保持係数

また、平均粒子径の異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤によるフタル酸ジブチルの逆相系 HPLC 評価における水-アセトニトリル溶離液中のアセトニトリル濃

度と保持係数との関係でも、化学組成と細孔構造がほぼ同一な合成吸着剤の場合には保持係数の差は発現せず、また水-アセトニトリル溶離液のアセトニトリル濃度と保持係数の関係もほとんど変化しない(Figure 5-3)。

これらの知見は、小粒子径合成吸着剤の HPLC 評価で目的化合物の分離精製条件を決定し、それを応用して粒子径の大きな合成吸着剤を使用した大スケール分離精製プロセスを構築することが可能であることを示している。

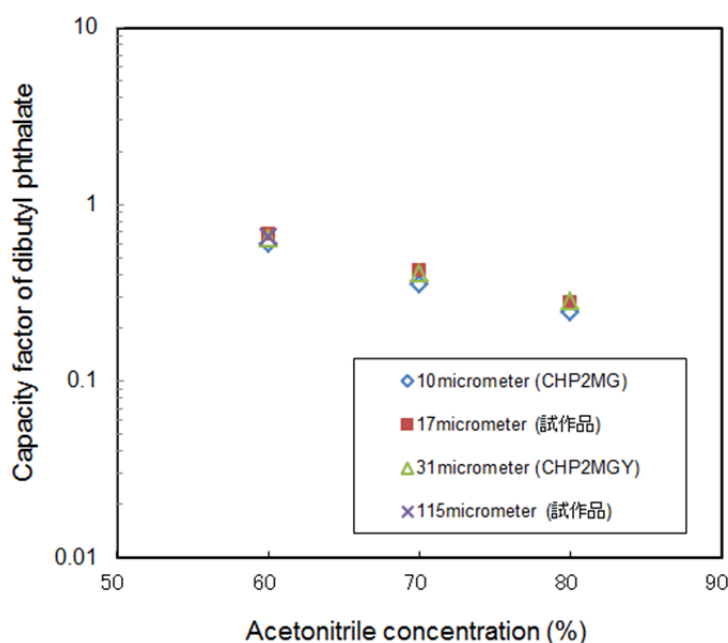


Figure 5-3. 様々な平均粒子径のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤のフタル酸ジブチルの逆相系 HPLC における水-アセトニトリル溶離液中のアセトニトリル濃度と保持係数の関係

なお、粒子径の異なる合成吸着剤を使用した逆相クロマトグラフィー分離のスケールアップについては、後に Yamamoto らによって理論的な検討結果が報告されている²⁸⁾。

大豆イソフラボンには抗酸化機能等を期待した健康食品として広く利用されている²⁹⁾。

大豆イソフラボンの主成分はダイゼインとゲニステインの配糖体であるダイジンとゲニスチンであるが、これらの大豆中の含有量は少なく、また夾雑物を含むため分離精製条件を検討する抽出液はポリスチレン系工業用合成吸着剤である HP20 で粗精製した。

即ち、粉碎した乾燥大豆を脱塩水中、50 °Cで 2 hr 抽出し、さらに 4,500 G で 10 分間遠心分離後、HP20 を充填したカラムに通液した。通液後 HP20 充填カラムは黄色に着色されたが、水洗後に 20 %メタノール水溶液と 80 %メタノール水溶液を順次通液して、20 %メタノール水溶液では黄色の溶出液、80 %メタノール水溶液では薄桃色の溶出液を得た。

このうち、80 %メタノール水溶液で溶出したサンプルを平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤を充填した HPLC カラムで逆相系クロマトグラフィー分離することで分離条件を決定した。大豆抽出液、ダイゼイン並びにゲニステイン標品の HPLC クロマトグラム(Figure 5-4)から、ポリスチレン系合成吸着剤を使用して大豆イソフラボンを良好に分離できることと、抽出液中のダイゼインとゲニステインの割合が大豆中に存在する割合よりも高い³⁰⁾ことが理解できる。なおこの点については、Obata らは温水で抽出する際に大豆中の β -グルコシダーゼの作用でダイジンおよびゲニスチンの加水分解が進行したものと考察している³¹⁾。

平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用して設定した分離条件における平均粒子径 18 μm および 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用した逆相系クロマトグラム(Figure 5-5)では、平均粒子径の増大に伴ってそれぞれのピークの分離性は低下するものの、ダイゼインおよびゲニステインの分離は良好に維持されていた。更に、内径 32 mm、層高 465 mm のガラス製分取カラムに平均粒子径 18 μm のポリスチレン系合成吸着剤を充填して実施した粗精製大豆抽出物の逆相系分取 HPLC では、分離条件検討時の 20 倍に相当する粗精製大豆抽出物を負荷しても、平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤による分離と同様のクロマトグラムプロファイルが得られたこ

とから(Figure 5-6)、高度精製用小粒子径合成吸着剤の有効性が示された。

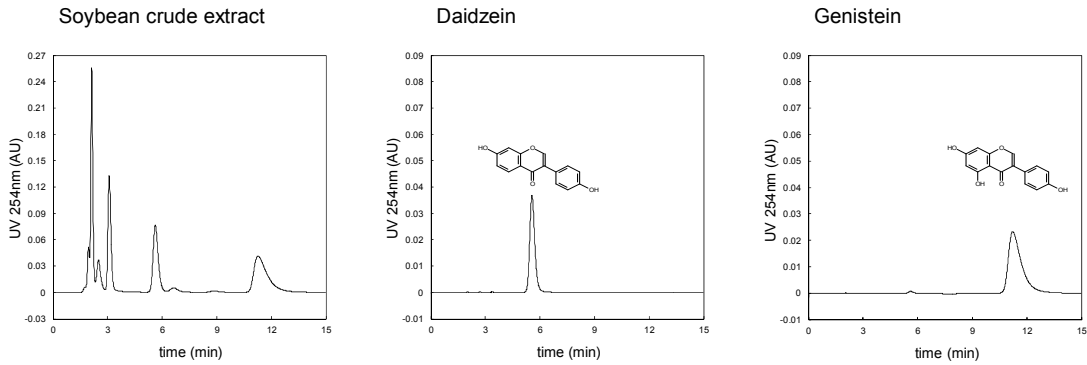


Figure 5-4. 平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用した粗精製大豆抽出物の逆相系 HPLC クロマトグラム

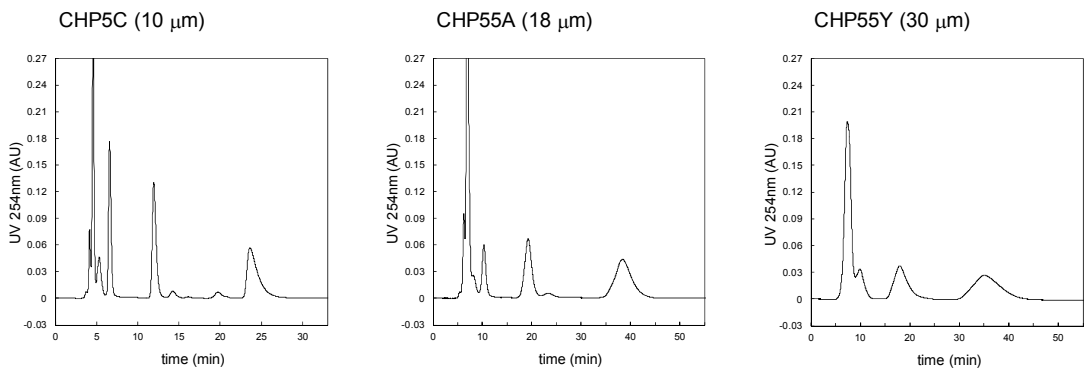


Figure 5-5. 平均粒子径が異なるポリスチレン系合成吸着剤を用いた粗精製大豆抽出物の逆相系 HPLC クロマトグラム

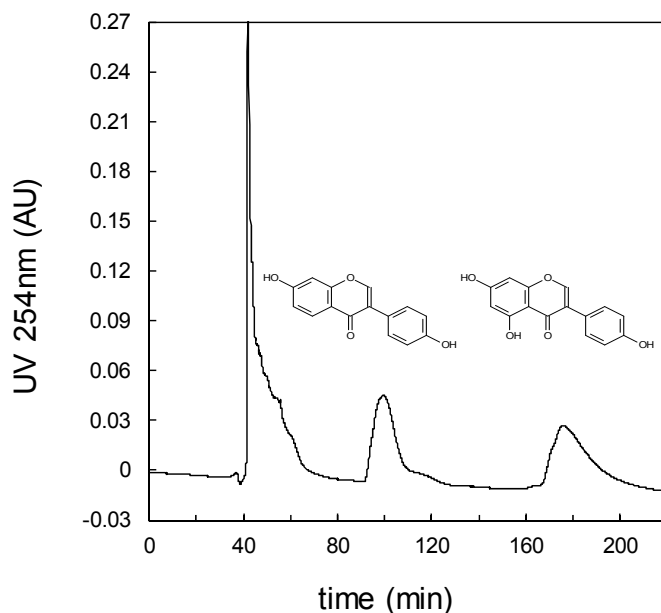


Figure 5-6. 平均粒子径 18 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用した粗精製大豆抽出物の逆相系分取 HPLC クロマトグラム

カテキン類は茶葉等に含有されるポリフェノール類³²⁾であり、抗酸化作用や抗菌活性を始めとする様々な機能性を持つ³³⁻³⁵⁾ことから食品添加物、特定保健用食品や医薬品としても利用されている³⁶⁾。

茶カテキン類の製造には工業用合成吸着剤を使用した吸脱着プロセスが広く用いられているが³⁷⁾、純粋な茶カテキンの単離を目的として粒子径 20 μm および 30 μm の合成吸着剤の分離特性を確認した。

平均粒子径 10 μm のポリスチレン系およびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を充填した HPLC カラムで逆相系クロマトグラフィー分離を行い、茶カテキン類の分

離挙動を比較した(Figure 5-7 と Figure 5-8)ところ、ポリスチレン系合成吸着剤は茶カテキン類の分離能が高く、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤ではカフェインの保持時間が茶カテキン類に比べて特徴的に短いことが判明した。食品添加物等の用途で茶カテキン類を粗精製する場合にはカフェインとの選択性が異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を、また、個々の茶カテキン類を精密分離精製するにはポリスチレン系合成吸着剤を使用すると効果的であり、目的に応じた合成吸着剤の選択が可能である。

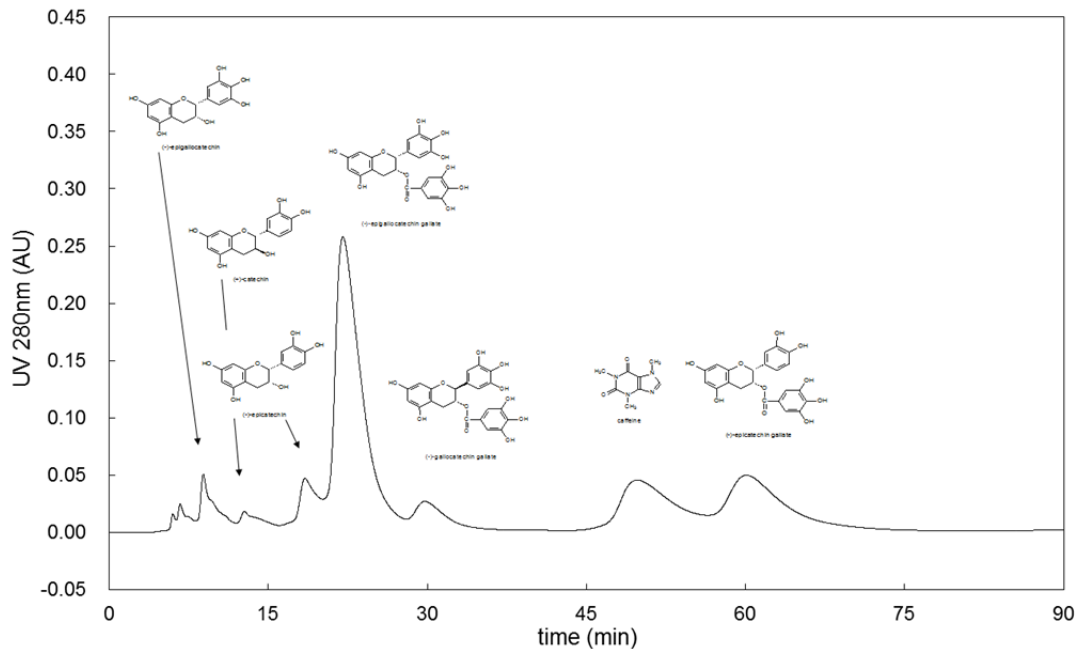


Figure 5-7. ポリスチレン系合成吸着剤 CHP5C を使用した茶カテキン類の逆相 HPLC クロマトグラム

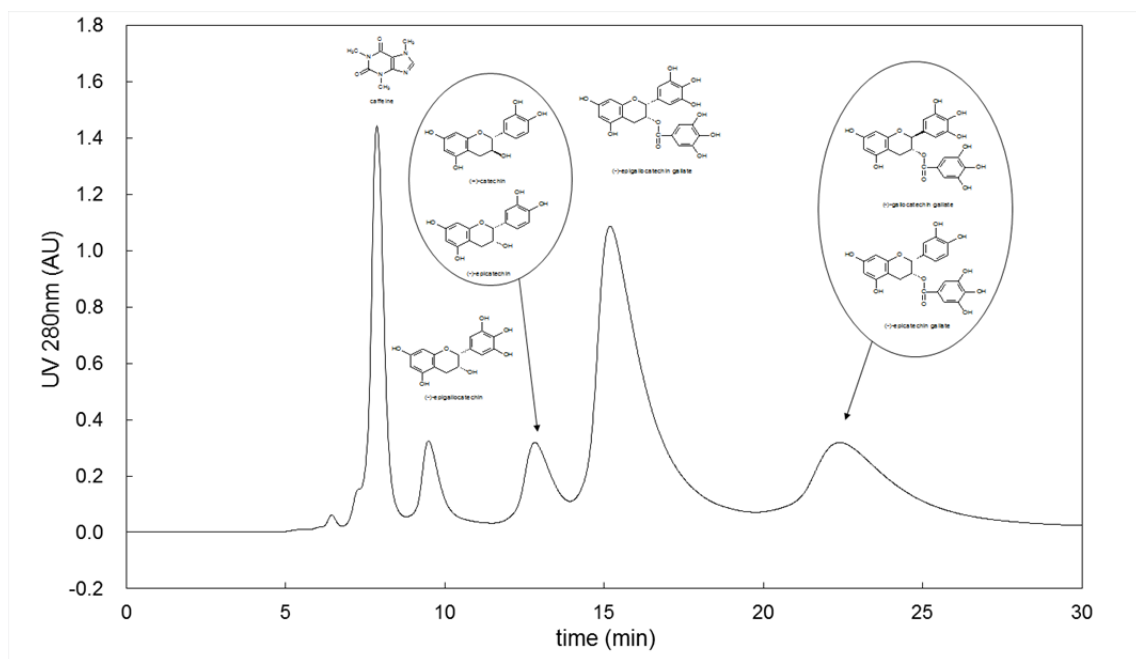


Figure 5-8. ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 CHP2MG を使用した茶カテキン類の逆相 HPLC クロマトグラム

次に、粒子径 10 μm の合成吸着剤を充填した HPLC カラムを使用して設定した溶離条件を使って、粒子径 20 μm と 30 μm の合成吸着剤による逆相系クロマト分取を検討したところ(Figure 5-9, 5-10)、ポリスチレン系、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤ともに粒子径によらず極めて類似した分離プロファイルを示したことから、粒子径 10 μm の合成吸着剤を充填した分析用 HPLC カラムによる分離検討を基盤として分取精製条件を決定できることが示された。

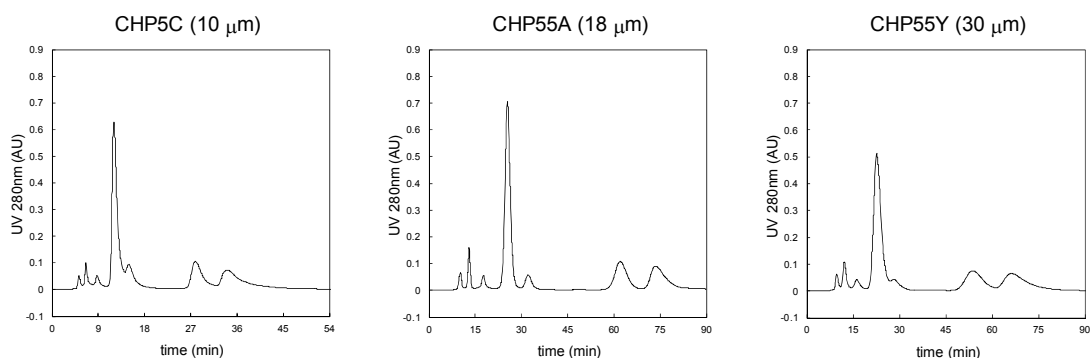


Figure 5-9. 平均粒子径の異なるポリスチレン系合成吸着剤による茶カテキン類の逆相系 HPLC クロマトグラム

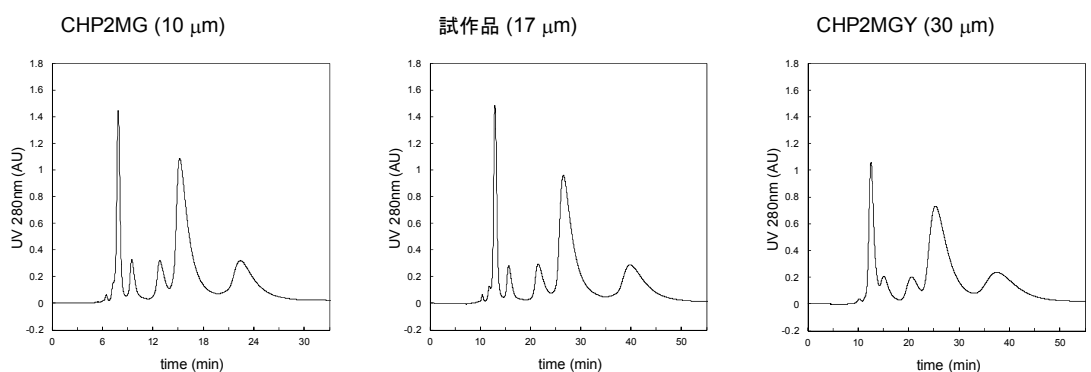


Figure 5-10. 平均粒子径の異なるポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤による茶カテキン類の逆相系 HPLC クロマトグラム

平均粒子径 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を使用した茶カテキン抽出物の分取 HPLC クロマトグラムと、得られた分取フラクションのオクタデシル基結合シリカゲル系 HPLC カラム分析により求めた(-)-エピガロカテキンガレートの純度(Figure 5-11)から、合成吸着剤単位体積あたりの茶カテキン抽出物の負荷量を 9.2 倍まで上げて Figure 5-10 と同一の分離プロファイルを示すとともに、カフェインとカテキン類の分離が維持されるとともに、純度の高い(-)-エピガロカテキンガレートのフラクションが得られることが判明した。

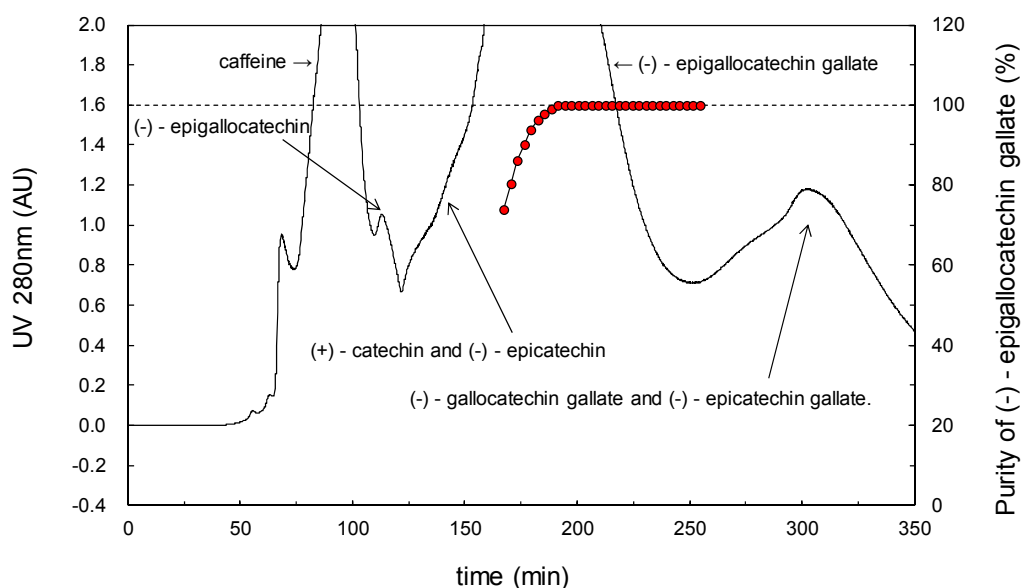


Figure 5-11. 平均粒子径 31 μm のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤による茶カテキン類の逆相系分取 HPLC クロマトグラム

引き続き平均粒子径 18 μm および 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用した茶カテキン抽出物の分取 HPLC クロマトグラフィーを実施した(Figure 5-12, 5-13)。ここでは(-)-エピガロカテキングレート(EGCG)の精製を目的としたため、分離初期には Figure 5-7 で用いた溶離液を使用し、(-)-エピガロカテキングレートの溶離ピークが出現したところでメタノール濃度の高い溶離液に切り替えて分離時間の短縮化を図った。オクタデシル基結合シリカゲル系 HPLC カラムによる分取フラクション分析の結果、(-)-エピガロカテキングレート純度 99%の画分が、平均粒子径 18 μm のポリスチレン系合成吸着剤を使用した場合には回収率 82%、平均粒子径 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤では回収率 61%で得られた。最終的に、平均粒子径 10 μm のポリスチレン系合成吸着剤を充填した HPLC カラムに負荷した茶カテキン抽出物の 22,400 倍が、平均粒子径 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤を充填した分取カラムに負荷されており、粒子径 20 μm と 30 μm のポリスチレン系およびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤の精密分離

精製プロセスにおける有用性が示された。

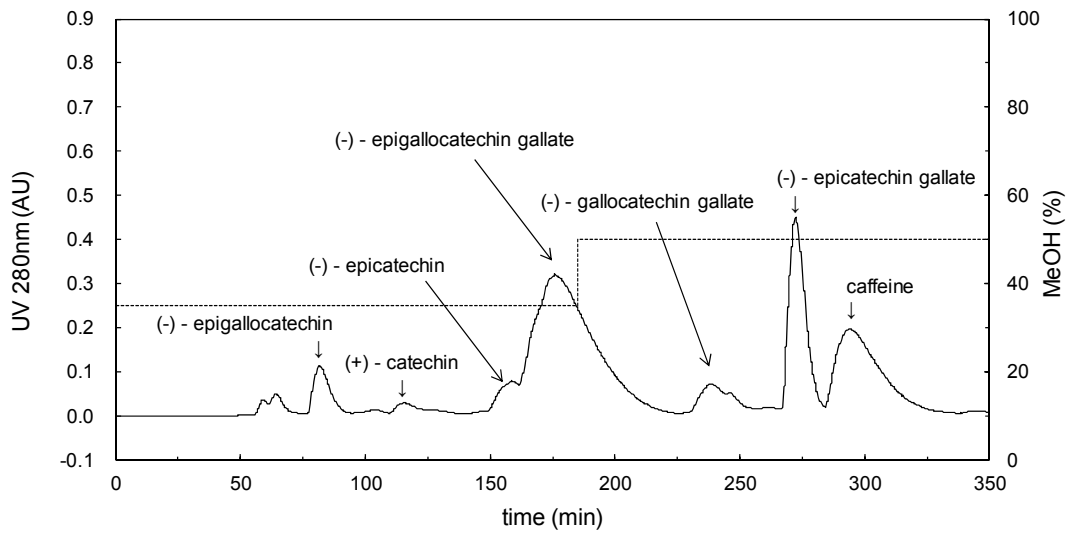


Figure 5-12. 平均粒子径 18 μm のポリスチレン系合成吸着剤による茶カテキン類の逆相系分取 HPLC クロマトグラム

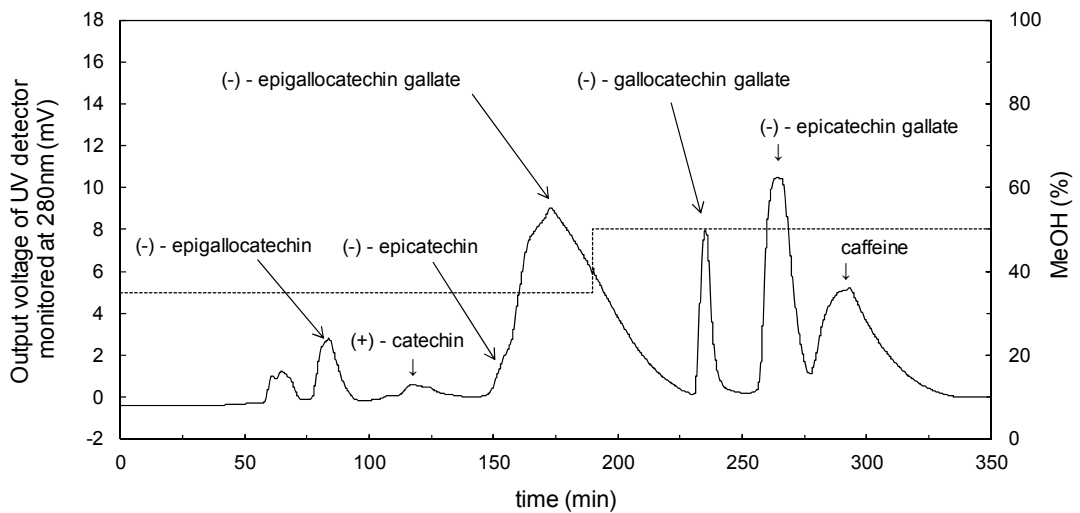


Figure 5-13. 平均粒子径 30 μm のポリスチレン系合成吸着剤による茶カテキン類の逆相系分取 HPLC クロマトグラム

第六章 結論

医薬品や機能性食品添加物の分離精製において重要な工程の一つである吸脱着工程やクロマトグラフィー工程で使用する合成吸着剤の適用性拡大を目指して新規合成吸着剤の開発と合成吸着剤による新規分離法の開発に従事し、4種の学術的かつ実用的な成果を挙げた。

1. 複数の工業用合成吸着剤を用いて、分子量の異なる様々な医薬品や機能性食品添加物の平衡吸着量を測定した。得られた平衡吸着量と合成吸着剤の細孔構造との相関を検証し、吸着量の最大化には吸着対象化合物の分子量と合成吸着剤の細孔径とのバランスが重要であることを明確化した。
2. 工業用合成吸着剤は、逆相系での吸脱着工程やクロマトグラフィー工程に多用されているが、順相系移動相の適用検討を実施し、合成吸着剤でも脂溶性医薬品や機能性食品添加物の分離精製が可能であることを明確にした。
3. 医薬品や機能性食品添加物の分離精製要求水準の高度化への対応として、合成吸着剤のクロマトグラフィー分離挙動の特性化を行い、化合物中に存在する炭素-炭素不飽和結合に対する強い相互作用に基づく特徴的な分離挙動を示すことを明らかにした。
4. 医薬品や機能性食品添加物の分離精製要求水準の高度化に対応すべく、工業用合成吸着剤の粒子径範囲である $100\ \mu\text{m}$ ~ $500\ \mu\text{m}$ より小粒子径の合成吸着剤を開発した。粒子径 $20\ \mu\text{m}$ および $30\ \mu\text{m}$ のポリスチレン系合成吸着剤を商品化するとともに、粒子径 $30\ \mu\text{m}$ のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤を商品化した。また、各粒子径の合成吸着剤の分離性を評価した。小粒子径合成吸着剤が充填された HPLC カラムを用いて目的化合物の分離精製条件を最適化したところ、粒子径の大

きな合成吸着剤を用いた効率的な分取精製プロセスの構築が可能であることを示した。

以上著者は、新規合成吸着剤の開発・商品化とともに、合成吸着剤を利用した様々な新規分離法を開発した。これらの合成吸着剤や分離法を利用することで、医薬品や機能性食品添加物の精製効率の向上と工業化への寄与が期待される。

以上の研究結果は、以下の学術論文に報告した。

- 1) “Characterization of synthetic adsorbents with fine particle sizes for preparative-scale chromatographic separation”, Adachi T., Ando S., Watanabe J., *Journal of Chromatography A*, **2002**, 944, 41–59.
- 2) “Use of synthetic adsorbents in preparative normal-phase liquid chromatography”, Adachi T., Isobe E., *Journal of Chromatography A*, **2003**, 989, 19–29.
- 3) “Fundamental characteristics of synthetic adsorbents intended for industrial chromatographic separations”, Adachi T., Isobe E., *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1036, 33–44.

謝辞

本研究に関して博士論文審査の機会を賜り、また本論文の作成にあたりまして終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬品化学研究室・佐治木弘尚教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を実施する機会を頂きました三菱ケミカル株式会社に、また本研究の博士論文審査申請の許可を頂きました三菱ケミカル株式会社・イオン交換樹脂事業部・大熊喜之事業部長、三菱ケミカル株式会社・黒崎研究所・山本正規所長、三菱ケミカル株式会社・黒崎研究所・イオン交換樹脂研究室・畚野信剛室長に感謝の意を表します。

学術論文執筆時の上司であり、本研究の推進にあたり有益な御助言と御指導を頂きました株式会社三菱ケミカルリサーチ・渡辺純哉氏、三菱ケミカル株式会社・イオン交換樹脂事業部・磯部英二氏に感謝致します。

また実験に際して御協力頂きました安藤信吾氏、水野（瀧本）康子氏、加藤（本庄）里保氏ほか、当時および現在の三菱ケミカル株式会社・イオン交換樹脂研究室の諸氏に感謝致します。

実験の部

本研究に用いた合成吸着剤は三菱ケミカル株式会社の製品もしくは試作品を使用した。また、特に明記しない限り、実験で使用した全ての化学薬品は商業的に入手し、精製することなく使用した。

第二章 第二節に関する実験

Table 2-1, Figure 2-2に関する実験

合成吸着剤の特性値は比表面積、細孔容積および細孔半径を除きダイヤイオンマニュアル 1³⁸⁾に記載した方法で現・三菱ケミカル株式会社 黒崎事業所 品質保証部 イオングループにて測定した値を使用した。

合成吸着剤の比表面積はMicromeritics社 (Norcross, GA, USA) 製 FlowSorb 2300 を用い、BET 1点法で測定した。細孔容積および細孔分布はMicromeritics社製 ASAP 2400 で測定した。いずれの測定でも窒素ガスを使用した。

第二章 第三節に関する実験

Table 2-2に関する実験

合成吸着剤の特性値は比表面積、細孔容積および細孔半径を除きダイヤイオンマニュアル 1³⁸⁾に記載した方法で現・三菱ケミカル株式会社 黒崎事業所 品質保証部 イオングループにて測定した値を使用した。

合成吸着剤の比表面積はMicromeritics社 (Norcross, GA, USA) 製 FlowSorb 2300 を用い、BET 1点法で測定した。細孔容積および細孔分布はMicromeritics社製 ASAP 2400 で測定した。いずれの測定でも窒素ガスを使用した。

Table 2-3, Figure 2-4 ~ Figure 2-9に関する実験

セファレキシム、塩化ベルベリン、テトラサイクリン塩酸塩およびリファンピシムはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製、ウシインスリンは和光純薬製、ビタミンB12はキシダ化学製の試薬を使用した。緩衝液調製に用いた脱塩水はMillipore社 (Bedford, MA, USA) の Milli-Q システムで製造した (以降にて使用する「水」も同様)。

平衡吸着量は合成吸着剤5 mLをメスシリンダーで計量し、水切り後に300 mLの共栓付き三角フラスコに投入後、各濃度の化合物溶液をホールピペットで100 mL加え、ダイテック社製 恒温振盪器BM-41で温度5 °C、振盪速度100 strokes/minで18 h振盪

後、上澄み中の化合物濃度を島津製作所製 紫外一可視吸光光度計UV mini – 1240で測定し、吸着前後の化合物の濃度差から平衡濃度における化合物の吸着量を求めこれをプロットした。

第二章 第五節に関する実験

Figure 2-12に関する実験

島津製作所製 HPLCポンプLC-10ATを2台（流路洗浄に用いるリン酸緩衝液用ポンプとインスリン溶液通液用ポンプ）、紫外吸光光度計SPD-10A（分取用セル使用）およびコミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass-LC10から成る動的吸着量測定装置を用意した。合成吸着剤を内径8 mm、長さ100 mmの共伸工業製ガラスカラムに充填し動的吸着量測定装置に取り付け、濃度を5 g/LとしたSigma社（St. Louis, MO, USA）製ウシインスリン試薬の50 mM リン酸緩衝液（pH: 2.6）溶液を流速1.25 mL/minで通液し、波長275 nmの吸光度を測定した。あらかじめカラムを付けない状態でウシインスリン溶液を通液して測定した吸光度を100 %とし、合成吸着剤充填カラム通液時に1 %濃度となった時点の通液量から1 % Breakthrough capacity (1 % BTC)を計算した。

Figure 2-13 ~ Figure 2-15に関する実験

アトー社製 チュービングポンプ、内径16 mm、長さ500 mmのジャケット付きガラスカラムと恒温循環水槽、島津製作所製 紫外一可視吸光光度計SPD-6AV（分取用セル使用）、日立製作所製フラクションコレクターL-5200および島津製作所製 コミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass-LC10から成る動的吸着量測定装置を用意した。

合成吸着剤40 mLをジャケット付きガラスカラムに充填し動的吸着量測定装置に取り付け、濃度を6 g/LとしたSigma社（St. Louis, MO, USA）製セファレキシン試薬の水溶液またはキシダ化学製ビタミンB12試薬の水溶液を平均流速2.67 mL/minまたは1.33 mL/minで通液し、波長260 nmまたは360 nmの吸光度を測定した。あらかじめカラムを付けない状態でセファレキシン水溶液またはビタミンB12水溶液を通液して測定した吸光度を100 %とし、合成吸着剤充填カラム通液時に5 %濃度となった時点の通液量から5 % Breakthrough capacity (5 % BTC)を計算した。

第三章 第二節に関する実験

Table 3-1に関する実験

合成吸着剤の粒子径分布および平均粒子径はBeckman Coulter社 (Indianapolis, IN, USA)製のMultisizer 3を用いた細孔電気抵抗法で測定した。

合成吸着剤の比表面積はMicromeritics社 (Norcross, GA, USA) 製 FlowSorb 2300を用い、BET 1点法で測定した。細孔容積および細孔分布はMicromeritics社製 ASAP 2400 で測定した。いずれの測定でも窒素ガスを使用した。

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験

日立製作所製 HPLCポンプL-7100 (低圧グラジエント仕様)、オートサンプラーL-7200 (サンプルループ容量: 100 μ L)、カラムオープンL-7300、紫外吸光光度計L-7400および島津製作所製 コミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass-LC10から成るHPLC装置を用意した。

ポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cとポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、比較対象としたBeckman Coulter社 (Fullerton, CA, USA, 学術論文執筆当時)製 シリカゲルUltrasphere Si は内径4.6 mm (学術論文でのFigure 2に記載の10 mmは誤記)、長さ250 mmのカラムサイズを用い、各濃度のヘキサン/イソプロパノール混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 $^{\circ}$ Cで通液した。

フタル酸ジアルキルエステル類の濃度は5 μ L/mLとし、CHP5CとCHP2MGには5.0 μ L、Ultrasphere Siには2.0 μ Lを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

非保持化合物として四塩化炭素を用い、紫外吸光光度計の波長を230 nmとしてクロマトグラムを採取し、その保持時間およびフタル酸ジアルキルエステル類の保持時間から保持係数を算出した。

第三章 第三節に関する実験

Figure 3-3に関する実験

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。充填カラム内径4.6 mm、長さ150 mmのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGにヘキサン/エタノール = 99/1混合溶媒を流速 0.5 mL/min、温度25 $^{\circ}$ Cで通液した。

ステアリン酸、リノール酸および γ -リノレン酸はSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬をヘキサン溶液濃度2 mg/mLとし、10 μ Lを注入し紫外吸光光度計の波長をステアリン酸は220 nm、リノール酸および γ -リノレン酸では210 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第三章 第四節に関する実験

Figure 3-4に関する実験

栃本天海堂社製 局方五味子（果実）20 gをミルにて粉碎後、200 mLのヘキサンにて50 °C、2h抽出した。抽出液をMillipore社（Bedford, MA, USA）製 Millicup-LHで濾過後、エバポレーターにて濃縮し1.95 gの残渣を得た。この残渣を濃度20 mg/mLのヘキサン溶液として五味子抽出物試料とした。また、schizandrin 標品は小城製薬社製の試薬を濃度0.5 mg/mL ヘキサン溶液として使用した。

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験と同一のHPLC装置を用い、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、平均粒子径 17 µm試作品およびCHP2MGYは内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、ヘキサン／エタノール = 90/10混合溶媒を線流速が180 cm/hとなる様にCHP2MGでは流速 0.50 mL/min、平均粒子径 17 µm試作品およびCHP2MGYでは流速 2.36 mL/minとし、温度25 °Cにて通液した。

試料注入量は合成吸着剤単位体積あたりの負荷量を同一にするためCHP2MGでは10 µL、平均粒子径 17 µm試作品およびCHP2MGYでは80 µLとし、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 3-5に関する実験

島津製作所製 HPLCポンプLC-10AS、オートサンプラーSIL-6B（サンプルループ容量: 2.0 mL）、紫外吸光光度計SPD-6A（分取用セル使用）およびコミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass-LC10から成るHPLC装置を用意した。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGYを内径20 mm、長さ500 mmのステンレスカラムに充填しHPLC測定装置に取り付け、ヘキサン／エタノール = 90/10混合溶媒を線流速が90 cm/hとなる様に流速 4.7 mL/minとし、温度25 °Cにて通液した。

Figure 3-4に関する実験にて調製した五味子抽出物残渣を様々なヘキサン溶液濃度に溶解して様々な負荷量にて注入し、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第三章 第五節に関する実験

Figure 3-7に関する実験

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、平均粒子径 17 μm 試作品およびCHP2MGYは内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、ヘキサン/エタノール = 98/2混合溶媒を線流速が180 cm/hとなる様にCHP2MGでは流速 0.50 mL/min、平均粒子径 17 μm 試作品およびCHP2MGYでは流速 2.36 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

米油由来の食品添加物であるオリザ油化社製「オリザ トコトリエノール30G」を濃度50 mg/mL ヘキサン溶液とし、注入量を合成吸着剤単位体積あたりの負荷量を同一にするためCHP2MGでは10 μL 、平均粒子径 17 μm 試作品およびCHP2MGYでは80 μL とし、紫外吸光光度計の波長を295 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 3-8に関する実験

Figure 3-5に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGYを内径20 mm、長さ500 mmのステンレスカラムに充填しHPLC測定装置に取り付け、ヘキサン/エタノール = 98/2混合溶媒を線流速が90 cm/hとなる様に流速 4.7 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

米油由来の食品添加物であるオリザ油化社製「オリザ トコトリエノール30G」を様々なヘキサン溶液濃度および様々な負荷量にて注入し、紫外吸光光度計の波長を295 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 3-9に関する実験

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、比較対象として用いたBeckman Coulter社 (Fullerton, CA, USA, 学術論文執筆当時)製 シリカゲル Ultrasphere Si は内径4.6 mm (学術論文でのFigure 9に記載の10 mmは誤記)、長さ250 mmのカラムサイズを用い、CHP2MGではヘキサン/イソプロパノール = 98/2混合溶媒を、Ultrasphere Si ではヘキサン/イソプロパノール = 99/1混合溶媒を線流速が360 cm/hとなる様に流速 1.00 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

米油由来の食品添加物であるオリザ油化社製「オリザ トコトリエノール30G」を濃度50 mg/mL ヘキサン溶液とし、5 μL を注入し紫外吸光光度計の波長を295 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 3-10に関する実験

Figure 3-1~ Figure 3-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、比較対象として用い

たBeckman Coulter社 (Fullerton, CA, USA, 学術論文執筆当時)製 シリカゲル Ultrasphere Si は内径4.6 mm (学術論文でのFigure 10に記載の10 mmは誤記)、長さ250 mmのカラムサイズを用い、CHP2MGではヘキサン/イソプロパノール = 98/2混合溶媒を、Ultrasphere Si ではヘキサン/イソプロパノール = 99/1混合溶媒を線流速が360 cm/hとなる様に流速 1.00 mL/minとし、温度25 °Cにて通液した。

Calbiochem・Novabiochem社 (学術論文執筆当時、San Diego, CA, USA) 製、DL- α -tocopherol, DL- β -tocopherol, DL- γ -tocopherolおよびDL- δ -tocopherolから成るTocopherol set (catalogue No. 613424)とDL- α -tocotrienol, DL- β -tocotrienol, DL- γ -tocotrienolおよびDL- δ -tocotrienolから成るTocotrienol set (catalogue No. 613432)を用い、濃度1 mg/mL ヘキサン溶液とし、CHP2MGでは10 μ Lを、Ultrasphere Siでは5 μ Lを注入し紫外吸光光度計の波長を295 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第三章 第六節に関する実験

Figure 3-11に関する実験

島津製作所製 HPLCポンプLC-10ASを2台 (高圧グラジエント仕様)、オートサンプラーSIL-10AF (サンプルループ容量: 50 μ L)、カラムオープンCTO-10ASvp、紫外-可視吸光光度計SPD-10AVvpおよびコミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass-LC10から成るHPLC装置を用意した。

充填カラム内径4.6 mm、長さ150 mmのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGを用い、ヘキサン/エタノール = 99/1混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

ビタミンK1, ビタミンK2およびコエンザイムQ10はSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を用い、50 μ Lを注入し紫外-可視吸光光度計の波長をビタミンK1, ビタミンK2は325 nm、コエンザイムQ10では275 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第三章 第七節に関する実験

Figure 3-13～Figure 3-14に関する実験

島津製作所製 HPLCポンプLC-10ATvpを2台 (高圧グラジエント仕様)、オートサンプラーSIL-10AF (サンプルループ容量: 50 μ L)、カラムオープンCTO-10ASvp、紫外-可視吸光光度計SPD-10AVvpおよびコミュニケーションバスモジュールCBM-10Aを介したPCデータ収集システムClass LC-10から成るHPLC装置を用意した。

充填カラム内径4.6 mm、長さ250 mmのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤

CHP2MGを用い、ヘキサン/エタノール = 87.5/12.5混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

カプサイシンは和光純薬社製、ジヒドロカプサイシンはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を用い、濃度1 mg/g エタノール溶液とし、20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

また、高砂薬業社製 トウガラシ末 1.00 gを100 mLヘキサン中、室温にて抽出後、Millipore社 (Bedford, MA, USA) 製 Millicup-LHにて濾過し、20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

カプシノイド類を含む味の素社製健康食品「カプシエイトナチュラ」(でんぷん、グリセリン、カラギナンおよびpH調整剤からなる被包剤中に内容物として唐辛子抽出物および菜種油を含み、1粒 0.33 g中に1.0 mgのカプシエイトを含む) 1粒中の内容物を、10.0 gのヘキサンに溶解し、20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第三章 第八節に関する実験

Figure 3-16～Figure 3-17に関する実験

Figure 3-13～Figure 3-14に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。充填カラム内径4.6 mm、長さ250 mmのポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGを用い、ヘキサン/エタノール = 70/30混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

アスタキサンチンはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を用い、エタノール飽和溶液の20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を470 nmとしてクロマトグラムを採取した。

また、市販ヘマトコッカス藻類抽出物であるオリザ油化社製 「アスタキサンチン20」 1.0 mgを1.00 gのAldrich社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬トリオレインに溶解し、20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

市販ヘマトコッカス藻類抽出物のケン化反応についてはオリザ油化社製 「アスタキサンチン20」 24 mgを12.0 gの0.02 M 水酸化ナトリウムのメタノール溶液に溶解し、室温で3 h反応した。この20 µLを注入し紫外-可視吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第四章 第二節に関する実験

Table 4-1およびTable 4-2に関する実験

日立製作所製 HPLCポンプL-7100（低圧グラジエント仕様）、オートサンプラーL-7200（サンプルループ容量: 100 μ L）、カラムオーブンL-7300、紫外吸光光度計L-7400 およびHPLCシステムマネージャD-7000を介したPCデータ収集システムから成るHPLC装置を用意した。ポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cとポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MG、および比較対象として用いたワイエムシィ社製YMC Pro C18は内径4.6 mm、長さ150 mmのカラムサイズを用い、アセトニトリル/水 = 50/50 混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 $^{\circ}$ Cにて通液した。

Table 4-1に示す化合物を常温で固体の化合物については2 mg/mL、常温で液体の化合物については2.0 μ L/mL濃度にて溶解した。試料注入量は各化合物のモル吸光係数の差異に応じて1~10 μ Lの範囲にて適切なピーク高さが得られる量を注入し、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

非保持化合物として1 %硝酸ナトリウム水溶液を用い、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取し、その保持時間および各種化合物の保持時間から保持係数を算出した。

各化合物の保持係数とTable 4-1に記載される特性値を用い、Microsoft社（Redmond, WA, USA）製 Excelを用いて重回帰分析計算を行い v , s , a , b および r を求めた。

第四章 第四節に関する実験

Figure 4-2に関する実験

Figure 3-13~Figure 3-14に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリスチレン系合成吸着剤CHP20/C10とポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CMG20/C10および比較対象として用いたPhenomenex社（Torrance, CA, USA）製 Luna C18 (2)は内径4.6 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、アセトニトリル/水 = 50/50混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 $^{\circ}$ Cにて通液した。

19-Nortestosterone, Testosterone, 19-Norethisterone および LevonorgestrelはSigma社（St. Louis, MO, USA）製の試薬を1 mg/mL アセトニトリル溶液とし、2 μ Lを注入し紫外可視吸光光度計の波長を230 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第四章 第五節に関する実験

Figure 4-4に関する実験

Figure 3-13~Figure 3-14に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリスチレン系合成吸着剤CHP20/C10および比較対象として用いたPhenomenex社（Torrance, CA,

USA)製 Luna C18 (2)は内径4.6 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、0.1 % ギ酸水溶液/0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液 = 60/40混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

ナスタチン、アムホテリシンBおよびフィリピンはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を用いて50 %アセトニトリル飽和溶液とし、10 µLを注入し紫外-可視吸光度計の波長をナスタチンでは305 nm、アムホテリシンBでは405 nm、フィリピンでは430 nmとしてクロマトグラムを採取した。

第五章 第二節に関する実験

Table 5-1, Table 5-2に関する実験

合成吸着剤の粒子径分布および平均粒子径はBeckman Coulter社 (Indianapolis, IN, USA)製のMultisizer 3を用いた細孔電気抵抗法で測定した。

合成吸着剤の比表面積はMicromeritics社 (Norcross, GA, USA) 製 FlowSorb 2300を用い、BET 1点法で測定した。細孔容積および細孔分布はMicromeritics社製 ASAP 2400 で測定した。いずれの測定でも窒素ガスを使用した。

Figure 5-1に関する実験

島津製作所製 HPLCポンプLC-8A、内径10 mm、長さ1000 mmのジャケット付きガラスカラム、圧力計および恒温循環水槽から成る水力学特性測定装置を用意した。

ポリスチレン系合成吸着剤吸着剤 CHP20AおよびCHP20Y、ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤 平均粒子径 17 µm試作品およびCHP2MGYの約50 mLをジャケット付きガラスカラムに入れ、温度25 °Cにて様々な流量にて脱塩水を通水し、カラム前後の差圧を測定した。また、その時のカラム層高を測定し、各流速における層高1 mあたりの圧力損失を計算した。

第五章 第三節に関する実験

Figure 5-2に関する実験

日立製作所製 HPLCポンプL-7100 (低圧グラジエント仕様)、オートサンプラー L-7200 (サンプルループ容量: 100 µL)、島津製作所製 カラムオープンCTO-6A、紫外吸光度計SPD-6AおよびクロマトパックC-R4Aから成るHPLC装置を用意した。

ポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cは内径4.6 mm、長さ150 mm、その他のポリスチレン系合成吸着剤は内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、アセトニトリル

／水 = 80/20混合溶媒をCHP5Cでは線流速が166 cm/hとなる様に流速 0.46 mL/min、その他のポリスチレン系合成吸着剤では流速 2.18 mL/minとし、温度25 °Cで通液した。

フタル酸ジアルキルエステル類の濃度は5 mg/mLとし、CHP5Cでは12.5 µL、その他のポリスチレン系合成吸着剤では100 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

非保持化合物として1 %硝酸ナトリウム水溶液を用い、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取し、その保持時間およびフタル酸ジアルキルエステル類の保持時間から保持係数を算出した。

Figure 5-3に関する実験

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、その他のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤は内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、様々な混合比のアセトニトリル／水混合溶媒をCHP2MGでは線流速が166 cm/hとなる様に流速 0.46 mL/min、その他のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では流速 2.18 mL/minとし、温度25 °Cにて通液した。

フタル酸ジブチルの濃度は5 mg/mLとし、CHP2MGでは12.5 µL、その他のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では100 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

非保持化合物として1 %硝酸ナトリウム水溶液を用い、紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取し、その保持時間およびフタル酸ジブチルの保持時間から保持係数を算出した。

Figure 5-4に関する実験

乾燥大豆30 gをミルにて粉碎後、150 mLの脱塩水にて温度50 °C、2h抽出し、4500 Gにて10 min遠心分離して清澄化抽出液を得た。

この抽出液を6.0 gの三菱ケミカル株式会社製スチレン系合成吸着剤HP20を充填した内径15 mm、長さ200 mmのBio-Rad社 (Hercules, CA, USA)製エコノカラムに負荷し、100 mLの脱塩水で洗浄後、50 mLの20 %エタノール水溶液および50 mLの80 %エタノール水溶液を順次通液し、80 %エタノール水溶液の通液画分を試料とした。

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用意し、充填カラム内径4.6 mm、長さ150 mmのポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cを用い、メタノール／0.1 M酢酸アンモニウム水溶液 = 80/20混合溶媒を流速 1.00 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

大豆抽出液試料10 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。また、ダイゼイン、ゲニステインはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を0.1 mg/mL溶液とし、1.0 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとして

クロマトグラムを採取した。

Figure 5-5に関する実験

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリスチレン系合成吸着剤 CHP5Cは内径4.6 mm、長さ150 mm、その他のポリスチレン系合成吸着剤は内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、メタノール/0.1 M酢酸アンモニウム水溶液 = 80/20混合溶媒をCHP5Cでは線流速が166 cm/hとなる様に流速 0.46 mL/min、その他のポリスチレン系合成吸着剤では流速 2.18 mL/minとし、温度25 °Cにて通液した。

Figure 5-4に関する実験にて調製した大豆抽出液試料をCHP5Cでは12.5 µL、その他のポリスチレン系合成吸着剤では100 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 5-6に関する実験

日立製作所製 HPLCポンプL-6250、島津製作所製 オートサンプラーSIL-8A（サンプルループ容量: 80 mL）、紫外吸光光度計SPD-7A、日立製作所製 フラクシオンコレクターL-5200および島津製作所製 クロマトパックC-R4Aから成るHPLC装置を用意した。

ポリスチレン系合成吸着剤CHP55Aを内径32 mm、長さ500 mmのMillipore社 (Bedford, MA, USA) 製 Vantage L VL 32 x 500ガラスカラムに充填した。充填層高は465 mm、充填体積は374 mLであった。

この充填カラムにメタノール/0.1 M酢酸アンモニウム水溶液 = 80/20混合溶媒を線流速が56 cm/hとなる様に流速 7.48 mL/minにて通液した。

Figure 5-4に関する実験にて調製された大豆抽出液試料37.4 mLを注入し紫外吸光光度計の波長を254 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 5-7およびFigure 5-8に関する実験

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。充填カラム内径4.6 mm、長さ150 mmのポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cおよびポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGを用い、CHP5Cではメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒を、CHP2MGではメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 60/40混合溶媒を流速 0.46 mL/min、温度25 °Cにて通液した。

茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60をそれぞれの溶離液に10 mg/mL 濃度に溶解し、10 µLを注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。また、(-) - epigallocatechin, (+) - catechin, (-) - epicatechin, (-) - epigallocatechin gallate, (-) - gallocatechin gallate, (-) - epicatechin gallate およびcaffeineはSigma社 (St. Louis, MO, USA) 製の試薬を用いて濃度1 mg/mLの50 %メタ

ノール溶液とし、1.0 μL を注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取し、その保持時間よりポリフェノン60のクロマトグラム中の各ピークの成分を決定した。

Figure 5-9に関する実験

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリスチレン系合成吸着剤CHP5Cは内径4.6 mm、長さ150 mm、その他のポリスチレン系合成吸着剤は内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、メタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒を線流速が166 cm/hとなる様にCHP5Cでは流速 0.46 mL/min、その他のポリスチレン系合成吸着剤では流速 2.18 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60を溶離液に10 mg/mL濃度に溶解し、CHP5Cでは10 μL 、その他のポリスチレン系合成吸着剤では47 μL を注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 5-10に関する実験

Figure 5-2に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGは内径4.6 mm、長さ150 mm、その他のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤は内径10 mm、長さ250 mmのカラムサイズを用い、メタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 60/40混合溶媒を線流速が166 cm/hとなる様にCHP2MGでは流速 0.46 mL/min、その他のポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤では流速 2.18 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60を溶離液に10 mg/mL濃度に溶解し、CHP2MGでは12.5 μL 、その他の合成吸着剤では100 μL を注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

Figure 5-11に関する実験

Figure 5-6に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。ポリメタクリル酸エステル系合成吸着剤CHP2MGYを内径30 mm、長さ500 mmの共伸工業社製ガラスカラムに充填した。

この充填カラムを用い、メタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 60/40混合溶媒を線流速が56 cm/hとなる様に流速 6.48 mL/minとし、温度25 $^{\circ}\text{C}$ にて通液した。

茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60を溶離液に100 mg/mL濃度に溶解し、1.63 mLを注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

フラクションコレクターに分取された充填カラムからの溶離液をGLサイエンス社製オクタデシル基結合型シリカゲルHPLCカラムODS-2 (内径4.6 mm、長さ150 mm) を

用いた逆相HPLCで分析し、各フラクション中の(-)-エピガロカテキンガレート濃度および純度を定量した。

Figure 5-12に関する実験

Figure 5-6に関する実験と同一のHPLC装置を用いた。

ポリスチレン系合成吸着剤CHP55Aを内径32 mm、長さ500 mmのMillipore社 (Bedford, MA, USA) 製 Vantage L VL 32 x 500ガラスカラムに充填した。充填層高は465 mm、充填体積は374 mLであった。

この充填カラムを用い、線流速が56 cm/hとなる様に流速 7.48 mL/minにてメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒を0 – 185分まで、メタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 50/50混合溶媒を185 – 350分まで、温度25 °Cにて通液した。

茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60をメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒に10 mg/mL濃度に溶解し、18.7 mLを注入し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

フラクションコレクターに分取された充填カラムからの溶離液をGLサイエンス社製オクタデシル基結合型シリカゲルHPLCカラムODS-2 (内径4.6 mm、長さ150 mm) を用いた逆相HPLCで分析し、各フラクション中の(-)-エピガロカテキンガレート濃度および純度を定量した。

Figure 5-13に関する実験

EYELA社製 VSP-2200ポンプ、相馬光学社製 紫外吸光光度計 S-310A model-II および島津製作所製 クロマトパックC-R4Aから成る中圧液体クロマトグラフ装置を用意した。

ポリスチレン系合成吸着剤CHP55Yを内径90 mm、長さ500 mmのMillipore社 (Bedford, MA, USA) 製 Vantage A2 VA90x500ガラスカラムに充填した。充填方法はアクシアルコンプレッション (Axial compression)法を用いて空気圧0.25 MPaにて充填し、充填層高は435 mm、充填体積は2,770 mLであった。

この充填カラムを用い、茶カテキン抽出物として栗田工業株式会社製ポリフェノン60をメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒に20 mg/mL濃度に溶解し、140 mLをVSP-2200ポンプにて線流速が52 cm/hとなる様に流速 55 mL/minにて注入し、次いでメタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 35/65混合溶媒を0 – 195分まで、メタノール/0.01 M酢酸水溶液 = 50/50混合溶媒を195 – 350分まで、VSP-2200ポンプにより流速 55 mL/min、温度25 °Cにて通液し紫外吸光光度計の波長を280 nmとしてクロマトグラムを採取した。

充填カラムからの溶離液をサンプリングし、GLサイエンス社製オクタデシル基結合型シリカゲルHPLCカラムODS-2 (内径4.6 mm、長さ150 mm) を用いた逆相HPLC

で分析し、各フラクション中の(-)-エピガロカテキンガレート濃度および純度を定量した。

引用文献

- 1) H. Takayanagi, J. Fukuda, E. Miyata, in M. Verrall (Editor), *Downstream Processing of Natural Products*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996, Ch. 11, p159.
- 2) 足立 正, *JETI*, **2003**, 51, p210.
- 3) F. P. Gailliot, in R. J. P. Cannell (Editor), *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, **1998**, Ch.2, p74.
- 4) C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*, American Chemical Society, Washington, DC., **1995**.
- 5) U.S. Environmental Protection Agency より提供されるプログラムソフトウェア The EPI (Estimation Programs Interface) Suite™ に含まれる KOWWIN™ v1.68 (September 2010)を用いて計算した。
- 6) E. N. Baker, T. L. Blundell, J. F. Cut[^]eld, S. M. Cut[^]eld, E. J. Dodson, G. G. Dodson, D.M.C.Hodgikin, R. E. Hubbard, N. W. Isaacs, C. D. Reynolds, K. Sakabe, N. Sakabe, N. M. Vijayan, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **1988**, 369, pB319.
- 7) 足立 正, *JETI*, **2009**, 57, p180.
- 8) E. L. Weiser, A. W. Salotta, A. M. Flach, L. R. Snyder, *J. Chromatogr.* **1984**, 303, p1.
- 9) J. Slanina, H. Paulova, E. Taborska, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, **1997**, 7, p53.
- 10) 里和スミエ, 岡本二郎, 山形正和, 七里泰, 馬場理一, 片山哲二, *日本老年医学会雑誌*, **1978**, 15, p165.
- 11) *ダイヤイオンマニュアル 2 (改定7版)*, 三菱ケミカル株式会社, p.326
- 12) 三菱ケミカル株式会社, トコフェロール類及びトコトリエノール類の分離方法, 特許第 4316185 号, 2009-08-19.

- 13) S, Sander, C. I. Coleman, A. A. Patel, J. Kluger, C. M. White, *J. Cardiac Failure*, **2006**, 12, p464.
- 14) 協和醗酵工業株式会社, 日本錬水株式会社, ユビキノン-10 の精製方法, 特願 2007-520176, 2006-06-09.
- 15) 坂本元彦, *基礎と臨床*, **1979**, 13, p 3931.
- 16) K. Kobata, T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai, T. Watanabe, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p1695.
- 17) 三菱化学株式会社, カプサイシノイド類の分離方法、カプシノイド類の分離方法およびカプサイシノイド類とカプシノイド類との分離方法, 特開 2010-77086, 2010-04-08.
- 18) E. A. Johnson, G. H. An, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **1991**, 11, p297.
- 19) 東ソー株式会社, カロテノイドの精製方法, 特開 2008-17736, 2008-01-31.
- 20) 三菱化学株式会社, カロテノイド類の分離方法, 特開 2010-43052, 2010-02-25.
- 21) 小西成樹, 白畑辰弥, 日高修平, 秋田士雄人, 齋藤誠也, 東島孝親, 種岡祐紀, 横山将来, 勝見達也, 永井隆之, 山田陽城, 梶英輔, 清原寛章, 小林義典, 日本薬学会 136 回年会要旨集, **2016**, p112.
- 22) J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p3619.
- 23) J. C. McGowan, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1984**, 34A, p38.
- 24) M. H. Abraham, J. C. McGowan, *Chromatographia*, **1987**, 23, p243.
- 25) M. H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.*, **1993**, 22, p73.
- 26) J. Zhao, P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, p 2623.
- 27) A. Osawa, K. Iki, G. Sandmann, K. Shindo, *J. Oleo Sci.*, **2013**, 62, p955.
- 28) S. Yamamoto, M. Hakoda, T. Oda, M. Hosono, *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1162, p50.

- 29) G. Cao, E. Sofic, R. L. Prior, *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, 22, p749.
- 30) T. Nguyenle, E. Wang, A. P. Cheung, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, 14, p221.
- 31) キッコーマン株式会社, イソフラボン化合物の製造法, 特開平 1-258669,
1989-10-16.
- 32) B. -L. Lee, C. -N. Ong, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 881, p439.
- 33) C. T. Ho, T. Osawa, M. T. Huang, R. T. Rosen, *Teas, Spices, and Herbs*,
- 34) American Chemical Society, Washington DC, **1994**, Food Phytochemical for
Cancer Prevention II.
- 35) A. G. Paschka, R. Butler, C. Y. -F. Young, *Cancer Lett.*, **1988**, 130, p1.
- 36) G. Gross, *Hautarzt*, **2008**, 59, p31.
- 37) 三井農林株式会社, 茶ポリフェノール組成物及びその製造方法, 特開 2006-36645,
2006-02-09.
- 38) ダイイオンマニュアル 1 (改定 6 版), 三菱ケミカル株式会社, p.125